

Западно-Казахстанский государственный медицинский
университет им. Марата Оспанова

УДК 616.379-008.64:615.03:577.27

На правах рукописи

УРАЗАЕВ ОЛЖАС НУРЛАНОВИЧ

**Оценка эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом
2 типа, леченных метформином**

6D110100 – Медицина

Диссертация на присуждение ученой степени
доктора философии PhD

Научный руководитель
доктор медицинских наук,
профессор Е.Ж. Бекмухамбетов

Научный консультант:
кандидат медицинских наук
С.С. Искакова

Зарубежный консультант:
MD, PhD, Professor
G. Dworacki

Республика Казахстан
Актобе, 2015

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	6
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	8
ВВЕДЕНИЕ	10
1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАРУШЕНИИ ИММУНОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1 Сахарный диабет и онкологические заболевания.....	15
1.1.1 Эпидемиологические исследования связи между диабетом и злокачественными новообразованиями	15
1.1.2 Потенциальные факторы и механизмы, способствующие связи между диабетом и злокачественными новообразованиями.....	18
1.2 Сахарный диабет и иммунная дисфункция	24
1.3 Значение эмиграции Т-клеток из тимуса в иммунном надзоре.....	26
1.3.1 Роль тимуса в иммунной системе.....	26
1.3.2 Вклад тимического выброса в поддержании периферического Т-клеточного пула	29
1.3.3 Идентификация недавних эмигрантов тимуса.....	30
1.3.3.1 Определение недавних эмигрантов тимуса у экспериментальных животных.....	30
1.3.3.2 Определение недавних эмигрантов тимуса у людей. Метод определения Т-рецепторных эксцизионных колец.....	31
1.4 Значение интерлейкина-7 для Т-клеток.....	34
1.5 Эффекты метформина в контексте сахарного диабета, злокачественных опухолей и Т-клеток.....	36
1.5.1 Молекулярный механизм гипогликемического действия метформина.....	36
1.5.2 Потенциальный механизм противоопухолевого действия метформина.....	38
1.5.3 Действие метформина на Т-клетки.....	40
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Характеристика пациентов, участвовавших в исследовании.....	42
2.2 Методы исследования.....	42
2.2.1 Биохимические методы исследования.....	42
2.2.2 Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	43
2.2.3 Метод проточной цитофлюориметрии.....	44
2.3 Статистическая обработка данных.....	47

3	КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП.....	48
4	КОНЦЕНТРАЦИЯ Т-РЕЦЕПТОРНЫХ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ (ТРЕС) В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	49
5	РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ CD132 и CD127 И ИХ ЭКСПРЕССИЯ НА НАИВНЫХ, CD4⁺, CD8⁺ Т-КЛЕТКАХ И Т-КЛЕТКАХ ПАМЯТИ.....	51
5.1	Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127 ⁺ CD132 ⁻ (RTE) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа.....	51
5.1.1	Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127 ⁺ CD132 ⁻ в субпопуляции наивных CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	51
5.1.2	Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127 ⁺ CD132 ⁻ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	52
5.1.3	Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127 ⁺ CD132 ⁻ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	54
5.1.4	Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127 ⁺ CD132 ⁻ в субпопуляции Т-клеток памяти CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа.....	56
5.2	Содержание CD127 ⁺ CD132 ⁺ Т-клеток (типичные эмигранты) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа....	56
5.2.1	Содержание CD127 ⁺ CD132 ⁺ в субпопуляции наивных CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	56
5.2.2	Содержание CD127 ⁺ CD132 ⁺ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа	58
5.2.3	Содержание CD127 ⁺ CD132 ⁺ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	59
5.2.4	Содержание CD127 ⁺ CD132 ⁺ в субпопуляции Т-клеток памяти CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа.....	60
5.3	Исследование содержания CD127 ⁻ CD132 ⁺ Т-клеток (окончательно дифференцированные эмигранты) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа.....	61
5.3.1	Исследование содержания CD127 ⁻ CD132 ⁺ в субпопуляции наивных CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	61
5.3.2	Исследование содержания CD127 ⁻ CD132 ⁺ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	62
5.3.3	Исследование содержания CD127 ⁻ CD132 ⁺ в субпопуляции CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа.....	63

5.3.4 Исследование содержания CD127 ⁻ CD132 ⁺ в субпопуляции Т-клеток памяти CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа.....	64
6 АНАЛИЗ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА – 7 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	68
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	75
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	96
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	97
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	98

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001 – (Межгосударственный стандарт) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.101-98 – (Межгосударственный стандарт) Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно-исследовательских работ.

ГОСТ 7.1-84 – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93 – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54-88 – Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

1,5-ангидроглюцитол (1,5-AG) – естественный моносахарид, маркер острой гипергликемии. Тест 1,5-AG предназначен для выявления гликемической вариабельности у людей с сахарным диабетом, которые имеют нормальные или близкие к нормальным значениям уровни гликогемоглобина.

АМПК (AMP Activated Protein Kinase) – монофосфат-аденозин активируемая протеинкиназа является ферментом, состоящий из трех белков и играющий важную роль в клеточном энергетическом гомеостазе.

CD (Cluster of Differentiation) – система маркерных антигенов или дифференцированных кластеров антигенов.

CD127 – рецептор для интерлейкина – 7.

CD132 - подразделение рецепторов цитокинов, который является общим для шести различных рецепторов интерлейкина: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21.

mTOR (Mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина в клетках – путь выживания клеток, который играет важную роль в регуляции роста и пролиферации клеток путем мониторинга доступности питательных веществ, клеточных энергетических уровней, уровней кислорода и митогенных сигналов.

PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinase) – фосфатидилинозитол-3-киназы представляют собой семейство ферментов, участвующих в клеточной функции, таких как рост клеток, пролиферация, дифференцировка, подвижность, выживание и внутриклеточный транспорт, участвующий в злокачественном процессе

RAG (recombination activating gene) – ген, активирующий рекомбинацию, кодирующий ферменты, которые играют важную роль в перестройке и рекомбинации генов иммуноглобулина и VDJ сегментов T-клеточного рецептора, состоит из RAG1 и RAG2.

Гипергликемия – клинический симптом, обозначающий увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови по сравнению с нормой.

Гликогемоглобин (HbA_{1c}) – гемоглобин, образующийся в результате неэнзиматической реакции между гемоглобином А и глюкозой сыворотки крови, достоверный предиктор микрососудистых и макрососудистых осложнений.

Иммунная система – система органов, существующая у позвоночных животных и объединяющая органы и ткани, которые защищают организм от заболеваний, идентифицируя и уничтожая чужеродные антигены, в том числе опухолевые клетки и патогены.

Иммунологический (иммунный) надзор – способность распознавать и отторгать измененные клетки собственного организма (непрерывное иммунологическое наблюдение).

Инволюция тимуса – обратное развитие тимуса, сопровождающееся уменьшением количества лимфоцитов с развитием жировой ткани.

Инсулинорезистентность – состояние сниженной чувствительности периферических тканевых рецепторов к биологическому действию инсулина.

Интерлейкин-7 – лимфопоэтический фактор роста, синтезируемый стромальными клетками костного мозга, лимфатическими узлами и клетками тимуса. Играет важную роль в созревании и размножении клеток лимфоидного ряда.

Недавние эмигранты тимуса (recent thymic emigrants) – самая молодая популяция Т-клеток, которые последними завершили внутритимусное развитие, эмигрировали на периферию и подверглись только нескольким клеточным делениям.

С-пептид – белковая часть молекулы проинсулина, образующегося в процессе синтеза инсулина.

Тимический выброс (thymic output) – эмиграция или экспорт Т-клеток из тимуса в периферические лимфоидные органы.

Т-клеточный рецептор – поверхностные белковые комплексы Т-лимфоцитов, ответственные за распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпредставляющих клеток, образуются в результате реарранжировки гена путем случайной перестановки различных сегментов ДНК V (variable), D (diversity) и J (joining).

Цитокины – гормоноподобные молекулы, действие которых на клетки-мишени опосредуется высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами. Цитокины обеспечивают межклеточные взаимодействия.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AACE/ACE	– American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology – Американская Ассоциация клинических эндокринологов и Американская коллегия эндокринологов
AMPK	– AMP Activated Protein Kinase – аденозин-монофосфат-зависимая протеинкиназа
BrdU	– Bromodeoxyuridine – бромдеоксиуридин
ELISA	– Enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментный анализ
FITC	– Fluorescein isothiocyanate – флуоресцеина изотиоцианат
GFP	– Green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок
HbA _{1c}	– Glycated hemoglobin – гликированный гемоглобин
IGF-1	– Insulin growth factor-1 – инсулиноподобный фактор роста-1
IL	– Interleukin – интерлейкин
LKB-1	– Liver kinase B1 – печеночная киназа B1
MFI	– Mean fluorescence intensity – средняя интенсивность флуоресценции
MHC	– Major Histocompatibility Complex – главный комплекс гистосовместимости
mTOR	– Mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина в клетках
NF- κ B	– Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – нуклеарный фактор каппа-В-лимфоцитов
OCT1	– Organic cation transporter 1 – органический катионный транспортер
PBMC	– Peripheral Blood Mononuclear Cells – мононуклеарные клетки периферической крови
PI3K	– Phosphatidylinositol 3-kinase – фосфатидилинозитол-3-киназа
PTK7	– Protein tyrosine kinase 7 – протеин тирозинкиназа 7
RSS	– Recombination signal sequences – сигнал последовательностей рекомбинации
RTE	– Recent Thymic Emigrants – недавние эмигранты тимуса
S1P1	– Sphingosine-1-phosphatereceptor 1 – рецептор сфингозин-1-фосфата
TNF α	– Tumor necrosis factor-alpha – фактор некроза опухоли- α
TRAC	– T Cell Receptor Alpha Constant –Т-клеточный рецептор альфа константы
TREC	– T-cell receptor excision circles – Т-рецепторные экцизионные кольца
TSC2	– Tuberous sclerosis complex 2 – комплекс супрессора

	туберина 2
VLA-4	– Very Late Antigen-4 – очень поздний антиген-4
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ОР	- относительный риск
ОШ	– отношение шансов
ОХ	– общий холестерин
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СД2	– сахарный диабет 2 типа
СР	– соотношение риска
ТГ	– триглицериды

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. В настоящее время распространенность сахарного диабета растет во всех странах. В 2014 году в мире зарегистрировано 387 миллионов больных диабетом, прирост больных к 2035 году ожидается 205 миллионов человек, при этом значительная доля приходится на сахарный диабет 2 типа [1]. Аналогичная тенденция отмечается и в Казахстане. Эта статистика вызывает обеспокоенность еще и в связи с тем, что в последнее время многочисленные эпидемиологические исследования показали связь между сахарным диабетом и риском развития, прогрессированием и смертностью от некоторых видов злокачественных новообразований [2-4]. Как известно, онкологические заболевания занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всех странах [5]. Следовательно, если сахарный диабет, распространяемый в мире со скоростью эпидемии, связан даже с небольшим увеличением риска развития неоплазм, это может иметь значительные последствия на уровне популяции [6]. В связи с этим, для профилактики, диагностики и выбора правильной тактики лечения большое значение имеют знания о механизмах ассоциации этих двух сложных заболеваний.

Установлены потенциальные факторы, участвующие в процессе канцерогенеза у больных диабетом, включающие гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, гипергликемию, хроническое воспаление, ожирение [7-9]. Кроме того, нельзя исключать и потенциал лекарственных средств, необходимых для терапии обоих заболеваний, а значит, и способных усложнить эту ассоциацию [10]. Но в тоже время молекулярные механизмы связи сахарного диабета и злокачественных новообразований до конца не выяснены.

Современные данные дают основание считать, что повышенный риск канцерогенеза у больных диабетом также предполагает нарушение деятельности иммунной системы [11], а именно, ключевого органа иммунологического надзора - тимуса, обеспечивающего генерацию и выброс на периферию Т-лимфоцитов, играющих важную роль в иммунном ответе на чужеродные антигены [12]. При этом центральную роль в создании и поддержании разнообразия антигенраспознающего Т-клеточного рецептора играет пул Т-клеток, называемых недавними эмигрантами тимуса [13].

Имеются немногочисленные данные о влиянии сахарного диабета на функцию тимуса. Установлено, что сахарный диабет ведет к постепенной инволюции тимуса и потере большей части популяции тимоцитов за счет их апоптоза. Частое развитие инфекций у больных СД также связано с ослаблением Т-клеточного иммунитета. Описаны механизмы, участвующие в сложных отношениях между инфекцией, иммунным ответом, повреждением сосудистой стенки и развитием атеросклероза [14]. Кроме того, на иммунные ответы может повлиять ожирение, тесно связанное с метаболическими расстройствами, такими как сахарный диабет 2 типа и дислипидемия [15]. Ожирение ускоряет возрастную инволюцию тимуса на нескольких уровнях, включающих повышенный апоптоз развивающихся тимоцитов, снижение пула

предшественников Т-клеток и сокращение числа недавних эмигрантов тимуса [16, 17].

Метформин из группы бигуанидов в настоящее время является препаратом первой линии терапии сахарного диабета 2 типа [18-20], наиболее часто назначаемым препаратом в мире [21]. Многолетняя клиническая практика применения метформина у пациентов с сахарным диабетом 2 типа показала, что этот препарат помимо сахароснижающего действия обладает множествомплейотропных эффектов: оказывает антитромботическое, противовоспалительное, антиоксидантное действия; положительно воздействует на липидный профиль, эндотелиальную дисфункцию и др., что способствует его благоприятному воздействию на сердечно-сосудистую систему и профилактике поздних диабетических осложнений [22]. В дополнение к этому метформин является также эффективным в лечении синдрома поликистозных яичников [23], а также изучается в качестве противовирусного агента [24].

На протяжении последних лет в научном мире активно обсуждается значение метформина в профилактике и терапии ряда новообразований [25, 26]. В качестве основного молекулярного механизма, лежащего в основе противораковой активности метформина, рассматривается активация АМР-активированной протеинкиназы (AMP-activated protein kinase – АМРК). Активация АМРК приводит к модуляции белков, участвующих в некоторых биологических процессах, таких как трансляция белка, пролиферация клеток, синтеза жирных кислот, ароматазы и синтеза стероидов. Метформин воздействует на клеточную пролиферацию посредством модулирования инсулиновой сигнализации, регулирует повреждения ДНК и воспалительные реакции, нарушающие восстановительные процессы и активность фактора некроза опухоли- α , что в конечном счете тормозит рост опухолевых клеток [24, p. 313; 27].

В то же время малоизвестно о влиянии метформина на иммунную систему. Метформин был документально подтвержден в качестве агента, защищающего CD8⁺ опухоль-инфильтрирующие лимфоциты от апоптоза [28]. Показано, что метформин может способствовать ответам Т-клеток памяти [29], а также ингибировать пролиферацию и выживание клеток при лейкемии [30].

Таким образом, сахарный диабет сопровождается не только метаболическими нарушениями, но и ухудшением иммунного статуса, включая нарушение функций тимуса, ответственного за разнообразие антигенраспознающего репертуара Т-клеток. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальным является изучение характера эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, получавших терапию метформином.

Цель исследования. Провести анализ эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином.

Задачи исследования:

1. Определить концентрацию Т-рецепторных эксцизионных колец в моноклеарных клетках крови у больных сахарным диабетом 2 типа, получавших метформин.

2. Исследовать содержание недавних эмигрантов тимуса CD127⁺CD132⁻ в субпопуляциях Т-лимфоцитов (наивных, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках) в периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа, получавших метформин.

3. Изучить распределение типичных эмигрантов тимуса CD127⁺CD132⁺ в Т-клеточных субпопуляциях (наивных, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках) в периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа, получавших метформин.

4. Определить распределение окончательно дифференцированных эмигрантов тимуса CD127⁻CD132⁺ в субпопуляциях Т-клеток (наивных, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках) в периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа, получавших метформин.

5. Исследовать уровень интерлейкина-7 в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином.

Научная новизна. Впервые у пациентов сахарным диабетом 2 типа, получавших разные виды терапии, исследован тимический выброс по уровню концентрации Т-рецепторных эксцизионных колец в моноклеарных клетках периферической крови методом ПЦР в режиме реального времени и содержанию тимических эмигрантов по экспрессии рецепторов к интерлейкину-7 (CD127 и CD132) в субпопуляциях Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Выявленное нарушение тимического выброса у больных сахарным диабетом 2 типа выражалось в снижении уровня концентрации Т-рецепторных эксцизионных колец в моноклеарных клетках периферической крови и ослаблении эмиграции CD127⁺CD132⁻ в наивных Т-клетках, CD127⁺CD132⁻ в CD8⁺ Т-клетках и повышении эмиграции CD127⁺CD132⁻ в CD4⁺ Т-клеточной популяции.

Впервые зарегистрировано, что терапия метформином устраняла нарушенный сахарным диабетом тимический выброс, повышая концентрацию концентрации Т-рецепторных эксцизионных колец в моноклеарных клетках периферической крови и положительно влияя на ранние популяции эмигрантов тимуса, особенно на фракции CD127⁺CD132⁻ наивных и CD127⁺CD132⁻ CD4⁺ Т-клеток.

Впервые установлено, что у больных сахарным диабетом 2 типа уровень интерлейкина-7 не зависит от вида антидиабетической терапии.

Практическая значимость. Полученные результаты расширяют наши представления о потенциальных факторах канцерогенеза при сахарном диабете 2 типа, включающий не только митогенный эффект инсулина, но и нарушения в иммунном статусе. Установлено, что сахарный диабет 2 типа изменяет эмиграцию Т-клеток, являющихся важным звеном в иммунном надзоре. Значимость работы заключается и в том факте, что снижение тимического выброса может быть компенсировано широко применяемым

антидиабетическим препаратом первой линии - метформином, особенно в отношении недавних эмигрантов тимуса. Полученные в работе новые данные о позитивном эффекте метформина на Т-клеточное звено иммунитета являются базисом для дальнейшего изучения иммуномодулирующего действия метформина в экспериментальных и клинических условиях.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедр онкологии и визуальной диагностики (Приложение А), микробиологии, вирусологии и иммунологии (Приложение Б) и фармакологии (Приложения В и Г).

Основные положения, выносимые на защиту. Сахарный диабет 2 типа приводит к снижению содержания Т-рецепторных эксцизионных колец (ТREC), определяемых в мононуклеарных клетках периферической крови методом ПЦР в режиме реального времени. Монотерапия метформином частично повышает концентрацию TREC у больных СД2.

У больных СД2 методом проточной цитометрии выявлено снижение эмиграции пула CD127⁺CD132⁻ за счет наивной и CD8⁺ субпопуляций, в то время как в CD4⁺ субпопуляции отмечалось повышение количества этих клеток.

Монотерапия метформином у больных СД2 модулирует нарушенный тимический выброс путем нормализации содержания CD127⁺CD132⁻ (недавние эмигранты тимуса) среди наивных Т-клеток, а также способствует их гиперпролиферации в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов. В тоже время метформин не корректирует изменения в CD8⁺ субпопуляции, вызванные СД2.

У больных СД2 эффект метформина на тимический выброс не ассоциирован с действием интерлейкина-7, являющегося специфическим регулятором созревания тимоцитов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: X Международной научно-практической конференции «Экология. Радиация. Здоровье» (28-29 августа, 2014 года) г. Семей; II Международном Конгрессе «Профилактика и лечение метаболических нарушений и сосудистых заболеваний. Междисциплинарный подход» (24-25 ноября 2014 года, г. Москва, Россия); VII Международной научно-практической конференции «Научные открытия в эпоху глобализации» (20 сентября 2015 года, г. Казань, Россия); на межкафедральном заседании проблемной комиссии медико-биологических дисциплин ЗКГМУ им. Марата Оспанова (30 сентября 2015 года, г. Актобе).

Сведения о публикациях. По теме диссертационного исследования опубликовано 9 работ, из них: 2 публикации в международном научном издании, имеющим ненулевой импакт-фактор, входящим в международную базу данных по цитируемости Thomson Reuters – «European Cytokine Network» (импакт-фактор 1,80 в 2014 году), «Immunology» (импакт-фактор 3,795 в 2014 году); 1 – в международном научном издании, входящим в международную базу данных Scopus – «Georgian Medical News»; 3 – в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН

РК, 3 – в материалах международных научных конференций (в том числе зарубежных – 2).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 94 страницах компьютерного текста. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Текст иллюстрирован 15 таблицами и 18 рисунками. Список использованной литературы включает 289 источников.

Исследование проведено в рамках целевой научно-технической программы Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Разработка новых технологий охраны здоровья детей и репродуктивного здоровья» (номер госрегистрации 0114РК00485).

1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАРУШЕНИИ ИММУНОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Сахарный диабет и онкологические заболевания

1.1.1 Эпидемиологические исследования связи между диабетом и злокачественными новообразованиями

Сахарный диабет (СД) и злокачественные новообразования представляют собой два сложных, многофакторных, хронических и потенциально фатальных заболеваний во всем мире, распространенность которых неумолимо растет. Так, по данным Международной Диабетической Федерации (IDF) в 2014 году количество больных СД составило 387 миллионов, недиагностированный диабет составляет 46,3%, а ожидаемый прогноз к 2035 – более полмиллиарда больных диабетом, при этом значительная доля приходится на сахарный диабет 2 типа (СД2) [1]. По подсчетам Международного агентства исследований рака (International Agency for Research on Cancer – IARC) количество ежегодно диагностируемых новых случаев онкологических заболеваний к 2030 году увеличится на 69% (до 21 миллионов), смертность – на 72% (до 13 миллионов в год) [5]. В настоящее время онкологические заболевания являются второй причиной смерти, а сахарный диабет стоит на седьмой позиции по этому показателю [10, p. 583786]. Аналогичная картина относительно обоих заболеваний наблюдается и в Казахстане: национальная распространенность СД в 2014 году составляет 4,92% [1], ежегодный прирост числа больных со злокачественными новообразованиями по данным ВОЗ составляет 5% [31].

Эта статистика вызывает беспокойство еще и в связи с тем, что в последнее время многочисленные эпидемиологические исследования убедительно доказали, что сахарный диабет является одним из факторов многократного повышения риска образования различных опухолей, их прогрессирования и увеличения смертности от некоторых видов злокачественных новообразований [2, p. 225; 3, p. 543; 4, с. 218].

В таблице 1 представлены данные Американской ассоциации клинических эндокринологов и Американской коллегии эндокринологов (2013), отражающие риск развития злокачественных новообразований у больных СД2 [32].

Таблица 1 – Связь сахарного диабета 2 типа и риска развития злокачественных новообразований

Вид злокачественного новообразования	Риск	95% ДИ
1	2	3
Неходжкинская лимфома	ОР 1,19	1,04-1,35
Рак тела матки	ОР 2,10	1,75-2,53
Рак молочной железы	ОР 1,20	1,12-1,28
Рак печени (исследования случай-контроль)	ОШ 2,54	1,82-3,54
Рак печени (когортные исследования)	СР 2,50	1,93-3,24

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Рак предстательной железы	ОР 0,84	0,76-0,93
Рак мочевого пузыря	ОР 1,24	1,08-1,42
Рак поджелудочной железы	ОР 1,82	1,66-1,89
Колоректальный рак	ОР 1,30	1,20-1,40
<p>Примечания</p> <p>1 ОР – относительный риск;</p> <p>2 ОШ – отношение шансов;</p> <p>3 СР – соотношение риска;</p> <p>4 ДИ – Доверительный интервал</p>		

Риск развития рака поджелудочной железы один из высоких, причем ему подвержены пациенты с уже начальными стадиями развития сахарного диабета, являющийся не только фактором риска, но и этиологическим фактором с одинаковой частотой у мужчин и у женщин [33]. В исследовании случай-контроль Elena J. и соавт. (2013) установили, что пациенты, страдающие сахарным диабетом на 40% подвержены риску развития рака поджелудочной железы, чем здоровые лица. Пациенты, которые уже болеют СД2 от 2 до 8 лет, шансов на развитие рака поджелудочной железы в 1,8 раз больше. Однако у пациентов, страдающих СД2 более 9 лет, риска развития рака не наблюдалось [34]. По данным Joost H.G. (2014), сахарным диабетом 2 типа страдают около 75% пациентов с раком поджелудочной железы, когда при других видах рака распространенность СД2 составляет не более 30% [35]. Вместе с тем рак поджелудочной железы за счет повреждения панкреатических бета-клеток может вызвать диабетическое состояние [36].

Недавние систематические обзоры и мета-анализы когортных исследований показали, что сахарный диабет был связан с повышенной заболеваемостью гепатоцеллюлярной карциномы (СР составляет 2,01, 95% ДИ – от 1,61 до 2,51) [37, 38]. В проспективном исследовании установлено, что метаболические нарушения лежат в основе развития гепатоцеллюлярной карциномы, а ожирение является ее независимым этиологическим фактором [39].

Высокая статистически значимая связь обнаружена между диабетом и колоректальным раком. Мета-анализ, включающий 30 когортных исследований, показал, что больные сахарным диабетом имеют 19%-й риск развития колоректального рака, чем больные без диабета [40]. Кроме того, сахарный диабет является причиной повышенной смертности у больных колоректальным раком. Исследование проводилось у 6974 пациентов, страдающим раком толстой кишки, и 3888 больных раком прямой кишки, среди которых сахарный диабет выявлен у 12 и 10% больных соответственно. За время наблюдения летальный исход был зафиксирован у 611 (50%) из 1224 больных раком, страдающих диабетом, и 3817 (40%) из 9638 больных раком, не страдающих диабетом [41]. Недавний мета-анализ показал также, что общая смертность была значительно выше у больных сахарным диабетом и раком

толстой кишки (ОР – 1,12, 95% ДИ – 1,01-1,25) и больных раком прямой кишки с сахарным диабетом (ОР – 1,21, 95% ДИ – 1,03-1,4), чем у больных без диабета [42].

Сахарный диабет также является причиной повышенного риска развития рака молочной железы и эндометрия. Такой вывод позволили сделать результаты мета-анализа 20 когортных исследований, выявивший, что у женщин, страдающих диабетом, риск заболевания раком молочной железы оказался на 20% выше по сравнению с пациентами, не страдавшими диабетом (СР – 1,20, 95% ДИ – 1,12-1,28) [43, 44]. Мета-анализ 15 когортных исследований указывает на повышенный риск рака эндометрия (СР – 1,81 (1,38-2,37)) у больных диабетом женщин [45]. Хорошо известно, что рак молочной железы и эндометрия являются эстрогензависимыми злокачественными опухолями. При сахарном диабете гиперинсулинемия может увеличить уровень биологически активных эстрогенов в связи с чрезмерной секрецией андрогенов яичниками и снижения уровня белка, связывающего циркулирующие половые гормоны [46, 47]. Кроме того, установлено, что диабет был причиной 49%-го увеличения риска смерти у пациентов рака молочной железы [48].

По данным мета-анализа 11 когортных исследований сахарный диабет в значительной степени связан с повышенным риском рака почки (СР – 1,39 (1,09-1,78)). Ассоциация была сильнее у женщин (СР – 1,47 (1,18-1,83)), чем у мужчин (СР – 1,28 (1,10-1,48)). Увеличению заболеваемости раком почки способствуют сопутствующие диабету заболевания – гипертония и поздние стадии заболеваний почек [49].

Мета-анализ 29 когортных исследований подтвердил гипотезу о высокой заболеваемости рака мочевого пузыря у больных сахарным диабетом, более чем на 29%, что это характерно только в отношении мужчин. Вместе с тем диабет связан с повышенной смертностью от рака мочевого пузыря как у мужчин, так и у женщин [16, р. e56662]. Установлено, что частые инфекции мочевыводящих путей у пациентов сахарным диабетом также могут быть факторами повышенного риска развития рака мочевого пузыря [50].

Неоднозначны результаты исследований связи сахарного диабета и лимфом. Ragozzino M. и соавт. (1982) обратили внимание на повышенный риск развития лимфомы среди больных сахарным диабетом, но последующие 36 повторных анализов не обнаружили этой связи [51]. В другом когортном исследовании продолжительностью 26 лет не обнаружена связь между диабетом и Ходжкинской лимфомой, неходжкинской лимфомой и лейкоемией среди мужчин и женщин [15, р. 848]. Мета-анализ, включающий десять исследований случай-контроль и три проспективных когортных исследования выявили, что у пациентов с сахарным диабетом отмечается небольшая вероятность развития неходжкинской лимфомы, чем лимфомы Ходжкина, лейкоемии и миеломы. Однако при этом отмечалась существенная гетерогенность между исследованиями. Относительный риск между сахарным диабетом 2 типа и неходжкинской лимфомой составил 1,18 (95% ДИ – 0,99-1,42) среди исследований случай-контроль и 1,79 (95% ДИ – 1,30-2,47) среди проспективных когортных исследований [52]. По мнению Chao C. и соавт.

(2008) доказательства являются неубедительными из-за методологических недостатков, включенных в исследования случай-контроль [14, p. 480]. В то же время мета-анализ 26 рандомизированных клинических исследований показал более высокий риск развития неходжкинской лимфомы (особенно периферической Т-клеточной лимфомы), лейкемии, миеломы, но не лимфомы Ходжкина среди больных диабетом [53].

Интересна взаимосвязь рака предстательной железы с сахарным диабетом. Ранее проведенные исследования выявили закономерность низкого риска развития рака предстательной железы у больных сахарным диабетом, чем у здоровых лиц [54]. В месте с тем обновленный мета-анализ показал, что обратная связь между диабетом и риском развития рака простаты наблюдалась в исследованиях проведенных в США, но не в исследованиях других стран [55]. Протективный эффект сахарного диабета также наблюдался при различных стадиях рака предстательной железы в других мета-анализах [56]. Одно из возможных объяснений является низкий уровень тестостерона, наблюдающийся у больных сахарным диабетом, превращение которого в дигидротестостерон способствует росту клеток предстательной железы [57].

1.1.2 Потенциальные факторы и механизмы, способствующие связи между диабетом и злокачественными новообразованиями

В настоящее время установлены потенциальные факторы, участвующие в процессе канцерогенеза у больных СД2. К ним относятся: инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, гипергликемия, ожирение и сахароснижающие препараты.

СД2 характеризуется резистентностью к инсулину и, как следствие, гиперинсулинемией. Установлено, что повышенная секреция инсулина, С-пептида и увеличение инсулинорезистентности могут повышать риск развития рака [58, 59]. Инсулин осуществляет своё канцерогенное действие путем активирования сигнальных путей mTOR (mammalian target of rapamycin), влияет на фосфорилирование белка TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), циклическую аденозин-монофосфат-зависимой протеинкиназу АМПК (AMP Activated Protein Kinase), тем самым изменяет активность mTOR, которая приводит к усилению роста и пролиферации клеток [60]. Исследованиями доказано, что нарушение регуляции сигнальных путей, контролирующей активность mTOR, приводит к возникновению злокачественных опухолей [61]. Помимо прямого воздействия инсулина на раковые клетки, не исключается, что гиперинсулинемия способствует канцерогенезу через инсулиноподобный фактор-1 (insulin growth factor-1 – IGF-1). В условиях гиперинсулинемии инсулин связывает и активирует рецептор IGF-1, обладающий сильной митогенной и трансформирующей активностью. Путём активации своих рецепторов, IGF-1 ведет к фосфорилированию остатков тирозина в его киназных доменах. Это индуцирует аутофосфорилирование остатков тирозина и серина и формирование активных центров с субстратами инсулинового рецептора. Далее происходит активация сигнальных путей фосфатидилинозитол-3-

киназы (PI3K)/Akt/mTOR и митоген-активируемой протеинкиназы RAS/RAF/AMPK. Повышение экспрессии рецептора IGF-1 может вызывать онкогензависимую клеточную трансформацию, формирование опухоли и её метастазирование [62-64]. Следует отметить, что многие раковые клетки несут на себе большое количество инсулиновых и IGF-1рецепторов, активация которых сопровождается преимущественной стимуляцией митогенных эффектов [65]. Кроме того, гиперинсулинемия связана с чрезмерной секрецией андрогенов в яичниках и снижением уровня белка, связывающего циркулирующие половые гормоны, что приводит к более высокой концентрации биологически активных эстрогенов, которые известны как факторы риска развития гормонзависимых опухолей [46, p. 1627; 47, p. 486].

Эпидемиологические данные подтверждают наличие связи между гипергликемией и риском развития рака. У инсулинзависимых мышей было выявлено увеличение количества и размеров опухоли печени и уменьшение апоптоза по сравнению с инсулин-независимыми мышами, и этот феномен был восстановлен инсулинотерапией [66]. Хотя улучшение гликемического контроля не снижает риск развития рака у больных сахарным диабетом, на сегодняшний день гипергликемия является независимым фактором риска развития злокачественных новообразований. Возможные механизмы влияния гипергликемии на увеличения риска развития рака включают в себя, так называемые «непрямой эффект» и «прямой эффект». «Непрямой эффект» – это процесс, который происходит в других органах, а затем оказывает влияние на опухолевые клетки путем стимулирования продукции циркулирующих факторов роста (инсулин, IGF-1) и воспалительных цитокинов. «Прямой эффект» гипергликемии сводится к непосредственному действию на опухолевые клетки, усиливая пролиферацию, индуцируя мутации, увеличивая инвазию и миграцию клеток, изменяя сигнальные пути, связанные с канцерогенезом [4, с. 219]. В последнее время Wnt/ β -катенин-сигнализация была предложена в качестве ключевого канцер-ассоциированного пути. Гипергликемия усиливает этот сигнальный путь за счет накопления транскрипционно активного β -катенина независимо от гиперинсулинемии, адипокинов или воспаления [67].

Ожирение является общей гипотезой возникновения злокачественных новообразований и диабета [68]. Проспективное когортное исследование связи между избыточной массой тела, ожирением и смертностью от всех видов рака установило, что соотношение рисков составляет 1,52 (95% ДИ в пределах 1,13-2,05). И у мужчин, и у женщин индекс массы тела был связан с более высокими показателями смертности от неоплазм пищевода, толстой и прямой кишки, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, почек, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина и множественной миеломы [69]. Jagers J.R. и соавт. (2009) установили, что ожирение способствует повышению риска смертности от неоплазм до 24% [70].

Многие биологические механизмы ожирения приводят к развитию рака через прямое или косвенное воздействие ожирения на инсулин и

инсулиноподобный фактор роста-1, половые гормоны, адипокины, воспаление. Одновременная активация этих отдельных механизмов способствует усилению пролиферации, ингибирует апоптоз и увеличивает нестабильность генома [71, 72]. Инвазии опухолевых клеток способствует фактор некроза опухоли- α (tumor necrosis factor- α TNF- α), интерлейкин-6, лептин, свободные жирные кислоты и другие сосудистые факторы, высвобождаемые из жировой ткани [73].

Гетерозиготный генотип Gln/Arg полиморфного маркера Gln223Arg гена рецептора лептина LEPR, связанный с СД2 или нарушенной толерантностью к глюкозе, ассоциирован с увеличенным риском рака молочной железы и раком тела матки [74]. У женщин, носителей полиморфного варианта гена-предиктора сахарного диабета TCF7L2_rs7903146, риск колоректальной карциномы оказался повышен, а носительство другого предиктора диабета – полиморфизма интерлейкина 13_rs20541 снижало риск возникновения этой опухоли [73, p. 845]. Интересные результаты получены и при изучении факторов генетической предрасположенности к ожирению. Семь полиморфных локусов в ассоциированных с ожирением генах SEC16B/RASAL, TMEM18, MSRA, SOX6, MTCH2, FTO и MC4R были связаны с увеличением риска развития рака эндометрия на 15–30% [75].

Нарушение обмена веществ при диабете вызывает хроническое воспаление, способствующее генетической нестабильности и злокачественной трансформации клеток. При плохо контролируемом диабете нерегулируемый обмен веществ вызывает длительное воспалительное состояние, характеризующееся повышенными уровнями IL-6, фактора некроза опухоли-альфа TNF- α , С-реактивного белка и других маркеров хронического воспаления. Так, высокий уровень TNF- α активирует нуклеарный фактор каппа-В (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – NF- κ B), вызывающий трансдукцию сигнала и способствующий развитию и прогрессированию многих опухолей. NF- κ B участвует в пролиферации и выживании злокачественных клеток, стимулирует ангиогенез и метастазирование, подрывает приобретенный иммунитет [9, p. 133].

Следует отметить, что хроническое воспаление всегда сопровождается реакциями окислительного стресса. Активные формы кислорода повреждают липиды, белки и ДНК, запуская туморогенез [76, 77].

Большинство пациентов с диабетом в течение многих лет получают лечение различными препаратами, имеющие разные механизмы действия. Проведенные исследования выявили связь между использованием сахароснижающих препаратов и риском развития рака.

Инсулин является фактором роста, в связи с чем, можно предположить, что высокие уровни эндогенного или экзогенного инсулина могут стимулировать рост опухолевых клеток. Инсулин, в отличие от IGF-1, вызывает митогенный, но не мутагенный эффект, то есть он стимулирует пролиферацию клеток, не вызывая злокачественную трансформацию. Несмотря на это он может стимулировать рост трансформированных клеток, что облегчает их

неуязвимость иммунным надзором. На основании этого наблюдения было высказано предположение, что прямой эффект инсулина может частично объяснить рост заболеваемости раком в условиях гиперинсулинемии, таких как ожирение и сахарный диабет 2 типа [78]. Воздействие препаратов инсулина и его аналогов связано с повышенным риском развития рака поджелудочной железы, печени, почек, желудка и легких [79].

В 2009 году несколько крупных наблюдательных исследований показали, что использование аналогов инсулина, особенно использование инсулина гларгин, было связано с повышенным риском развития неоплазм, в том числе рака молочной железы [80-82]. Однако результаты этих первоначальных исследований были неубедительными и противоречивыми. Причины неоднозначности этих результатов были связаны с трудностями в методологических вопросах, оптимальной дозой и продолжительности действия инсулина, наличием информации возможных сопутствующих факторах [79, p. 333]. После тщательного анализа 31 рандомизированного клинического исследования эксперты констатировали, что применение инсулина гларгина не связано с повышенным риском развития злокачественных опухолей, в том числе и раком молочной железы, и подчеркнули важность продолжения долгосрочного наблюдения всех участников клинических испытаниях [83].

На сегодняшний день лечение диабета проводится чаще аналогами инсулина. Аналоги короткого действия гарантируют более точное управление диабетом с низким риском гипогликемии. На основании данных проведенных исследований преимущественно аналоги инсулина превышают потенциальные риски развития рака в большинстве случаев. Специалисты советуют с осторожностью использовать высокие дозы аналогов инсулина, особенно у больных с высоким риском развития злокачественных новообразований [78, p. 240634].

Окончательный вывод о взаимосвязи повышенного риска развития рака с терапией тиазолидиндионами трудно сформировать из-за малых размеров рандомизированных клинических исследований. Препараты этой группы повышают чувствительность к инсулину путем действия на жировую ткань, мышцы и печень, где они увеличивают утилизацию глюкозы и снижают её синтез [84, 85]. Экспериментальные исследования на животных о возможном риске развития рака после терапии тиазолидиндионов указывали об эффекте опухолевой супрессии путем влияния на ангиогенез, ингибирования инвазии клеточной дифференцировки, остановки клеточного цикла и индукции апоптоза [86]. Однако мета-анализ 17 наблюдательных исследований не подтвердил какой-либо ассоциации терапии тиазолидиндионами и риском развития злокачественных новообразований [87]. В настоящее время многочисленные исследования и систематические обзоры указывают на наличие высокого риска развития рака мочевого пузыря у пациентов, получавших пиоглитазон, особенно при увеличении дозы препарата и длительном его применении [88-93]. Stefan Z Lutz и соавт. (2014) считают, что использование тиазолидиндионов является

безопасным в контексте злокачественных заболеваний, за исключением пиоглитазона из-за его ассоциации с повышенным риском заболеваемости раком мочевого пузыря [94].

Существуют противоречивые эпидемиологические доказательства о заболеваемости злокачественными опухолями пациентов СД2, получающих препараты сульфонилмочевины. Они усиливают секрецию инсулина за счёт стимуляции бета-клеток поджелудочной железы, что вызывает высвобождение инсулина из внутриклеточных запасов. В результате восстанавливается чувствительность бета-клеток, увеличивается число инсулиновых рецепторов [95]. Мета-анализ с участием 315517 пациентов СД2 показал повышенный риск развития рака среди пациентов, получавших производные сульфонилмочевины, по сравнению с пациентами, не получавшими их. Однако данные других рандомизированных исследований не смогли подтвердить этот результат [96]. Результаты эпидемиологических исследований доказали повышенный риск развития рака поджелудочной железы, гепатоцеллюлярного и колоректального рака среди больных сахарным диабетом, получавших препараты сульфонилмочевины. Митогенные эффекты препаратов этой группы могут быть связаны прямо или косвенно с гиперинсулинемией [97, 98].

Pasello G. и соавт. (2013) в своей работе высказались об антимитогенном эффекте производных сульфонилмочевины, однако у пациентов, получавших глибенкламид и гликлазид, предполагаемого ингибирующего рост опухоли эффекта не обнаружено [99].

Терапия инкретиномиметиками относительно новая, в связи с чем, имеющиеся данные по модификации риска развития злокачественных новообразований, в частности рака поджелудочной железы и рака щитовидной железы, у экспериментальных животных и больных СД2 неоднородные, чтобы говорить об однозначных выводах [100]. Инкретины – это класс гормонов (глюкозозависимый инсулиотропный полипептид – ГИП и глюкагоноподобный пептид 1 – ГПП-1), которые регулируют уровень глюкозы в крови, вызывая секрецию инсулина и подавление секреции глюкагона в ответ на глюкозу [101]. Кроме того, они индуцируют пролиферацию β -клеток поджелудочной железы и регулируют апоптоз и дифференцировку клеток [102].

Метформин, представитель группы бигуанидов и наиболее широко назначаемый в настоящее время антидиабетический препарат, по данным многочисленных исследований показал антиканцерогенную активность. Так анализ базы данных 11 876 пациентов, заболевших СД2 в период с 1993 года по 2001 год, показал, что через год после выявления диабета 923 человека были госпитализированы по поводу рака. Установлено, что у больных, получавших метформин, относительный риск развития злокачественных новообразований по сравнению с больными, не принимавшими этот лекарственный препарат, снизился на 23%. По мере увеличения длительности приема метформина и дозы принятого препарата за все время лечения ОР достиг снижения на 43,5% [103].

Ряд дальнейших исследований также продемонстрировал снижение частоты некоторых злокачественных опухолей у больных СД2 при использовании метформина, в тоже время лечение сахарного диабета инсулином выявило повышенный риск развития рака [104-106]. В ретроспективном когортном исследовании, продолжавшемся в среднем 3,9 года, с участием 191233 пациентов СД2 (средний возраст — 56 лет, 49% женщин) и анализом выписываемых им рецептов, было выявлено 813 случаев рака. Хотя в основном это исследование оценивало динамику онкологической заболеваемости на фоне приема тиазолидиндионов, среди больных была выделена группа пациентов, получавших монотерапию метформином. При изолированном приеме метформина (по сравнению с больными, не получавшими этот препарат) были отмечены отсутствие влияния на риск возникновения рака мочевого пузыря (ОР – 0,99), тенденция к повышению риска возникновения рака поджелудочной железы (ОР – 1,26) и снижение риска развития колоректального рака (ОР – 0,67) и рака печени (ОР – 0,73) [107].

На основе двух других независимых мета-анализов эпидемиологических исследований сделан вывод, что метформин по сравнению с другими методами лечения снижает заболеваемость раком среди пациентов СД2 на 30-40% [108, 109]. Недавний мета-анализ также показал, что пациенты с сахарным диабетом, получавших метформин, имеют значительно меньший риск развития рака поджелудочной железы [110].

В 2010 г. Landman G. и соавт. (2010) опубликовали результаты проведенного в Нидерландах 10-летнего обсервационного проспективного исследования ZODIAC-16 (Zwolle Outpatient Diabetes project Integrating Available Care) с участием 1353 пациентов СД2 о влиянии метформина на смертность от онкологических заболеваний. Было отмечено, что прием метформина способствует снижению онкологической смертности, и этот эффект был тем выше, чем больше была суточная доза метформина. При сравнении полученных значений с показателями онкологической смертности в общей популяции было продемонстрировано, что у пациентов с СД2, не получавших метформин, онкологическая смертность была выше, чем в общей популяции, тогда как смертность у пациентов, получавших лечение метформином, была сопоставима с таковой в общей популяции [111].

Следует отметить, что были проведены ряд клинических испытаний среди пациентов, не страдающих диабетом. Применение низких доз метформина (250 мг/день) способствовало снижению маркера рака толстой кишки и снижению пролиферативной активности эпителия толстой кишки среди пациентов, не страдающих диабетом [112]. Кроме того, промежуточные анализы исследований, связанных с неоадьювантной терапией метформином у вновь диагностированных пациентов с раком молочной железы, показали, что метформин является безопасным средством, хорошо переносится и оказывает воздействие на обмен веществ, уровень инсулина, пролиферацию опухолевых клеток и апоптоз [113].

Принимая во внимание вышесказанное, следует констатировать, что связь между диабетом и риском развития злокачественных опухолей

различной локализации бесспорна. Однако этой негативной ассоциации способствуют и нарушения иммунного статуса, имеющего место при сахарном диабете.

1.2 Сахарный диабет и иммунная дисфункция

Хотя негативное воздействие диабета на сердечно-сосудистую систему, почки или сетчатку глаза привлекают большее внимание специалистов из-за потенциального их повреждения или даже летальных осложнений, тимус, центральный орган иммунного надзора, ответственного за генерацию и экспорт на периферию иммуно-компетентных Т-клеток, также поражается при сахарном диабете, о чем свидетельствуют результаты немногочисленных исследований.

В экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного диабета у мышей установлена быстрая инволюция тимуса, в течение одного дня после введения [114]. Последующие исследования показали, что стрептозотоцин-индуцированный диабет ухудшает созревание лимфоцитов в тимусе, тогда как другие исследования указывают, что одна доза стрептозотоцина не вызывает инволюцию тимуса, но может уменьшить процент зрелых тимоцитов в тимусе на более поздних стадиях (7-14 дней) после введения [115, 116].

Как уже было отмечено, хроническое воспаление, наблюдаемое при инсулинорезистентности и сахарном диабете 2 типа, играет ключевую роль в патогенезе за счет способности провоспалительных цитокинов ухудшить сигнализацию инсулина в инсулинчувствительных тканях. В работе Gruiá A.T. и соавт. (2011) показано, что избыток глюкозы может привести к постепенной инволюции тимуса путем повышенного апоптоза лимфоцитов. При этом в стромальных макрофагах тимуса накапливаются свободные жирные кислоты, в том числе и арахидоновая кислота, являющаяся субстратом для эйкозаноидов, которые в свою очередь модулируют активность макрофагов с целью фагоцитоза апоптических лимфоцитов. Следовательно, эти данные подтверждают причастность компонентов воспалительного пути в клеточных взаимодействиях при диабет-индуцированной инволюции тимуса [117]. Но тем не менее клинические исследования показали недостаточную эффективность противовоспалительных действий при СД2, включающие лекарственные препараты, нейтрализующие провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β) или транскрипционный фактор роста NF- κ B, особенно у больных сахарным диабетом с длительным течением [118]. Хотя эти данные можно интерпретировать как отсутствие пользы от иммуномодуляции у больных СД2, Ip B.C. и соавт. (2015), проанализировав имеющиеся на сегодня данные об иммунометаболизме диабета отметили, что в отличие от ожирения у мышей, преимущественно связанного с инсулинорезистентностью, 20-25% людей, страдающих ожирением, метаболически здоровы (чувствительность к инсулину высокая) [119].

Описаны механизмы, участвующие в сложных отношениях между инфекцией, иммунным ответом, повреждением сосудистой стенки и развитием атеросклероза [120]. Кроме того показано, что концентрация

провоспалительного хемокина RANTES, участвующий при различных видах иммунного ответа, тесно связана с уровнем постпрандиальной гипергликемией [121].

Показано, что ожирение, тесно связанное с метаболическими расстройствами, может повлиять на иммунные ответы [122, 123]. Как известно, жировая ткань состоит из адипоцитов и стромальной сосудистой фракции, в которой найдено множество иммунных клеток, в том числе макрофагов и Т-клеток. Прогрессирование ожирения сопровождается увеличением инфильтрации иммунных клеток с провоспалительным фенотипом [124, 125]. Установлено, что тучные люди имеют более высокие уровни жирных кислот в плазме по сравнению с худыми [126]. Несколько косвенных доказательств показывают, что жирные кислоты могут модулировать иммунный ответ. При этом уровни некоторых из них связаны с уровнями маркеров воспаления у здоровых людей [127]. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты могут быть окислены, генерируя провоспалительные или липидные медиаторы. Известно, что липидные медиаторы имеют сильную иммуномодулирующую способность [128]. Хотя не ясно, какие клетки несут ответственность за иммуномодулирующие эффекты жирных кислот, доказано, что эти липиды влияют на функции некоторых иммунных клеток, особенно антигенпредставляющих клеток и Т-клеток [129, 130]. Несколько экспериментальных исследований установили, что жирные кислоты являются токсичными для Т-клеток при введении их в высоких концентрациях, а при введении их в нетоксичных концентрациях индуцируются пролиферация и продукция цитокинов [131, 132].

Кроме того, жирные кислоты могут повлиять на пролиферацию Т-клеток, продукцию цитокинов в условиях *in vivo*. Так, некоторые исследования показали, что число Т-клеток снижено у тучных людей [133], а пролиферация Т-клеток и соотношение субпопуляций Т-клеток у них изменены по сравнению с худыми лицами. Механизмы, лежащие в основе этих различий между тучными и худыми лицами, остаются неясными [134, 135]. Таким образом, на функции и фенотип Т-клеток влияют жирные кислоты и их производные, тип и концентрация которых определяет исход этой модуляции. В процесс модуляции функций Т-клеток жирными кислотами могут быть вовлечены несколько механизмов: пассивный и активный механизмы. При пассивном механизме жирные кислоты диффундируют через мембрану Т-клеток в пассивном состоянии [136, 137]. Активный механизм опосредован клеточными рецепторами, при котором транспортные белки жирных кислот играют роль в поглощении, транспортировке, хранении и метаболизме жирных кислот [138, 139].

В эксперименте, а затем и в клинике установлено, что у лиц с ожирением, в том числе при СД2, тимопоз обратно пропорционален ИМТ, а концентрация TREC в периферических лимфоцитах снижена, как и концентрация наивных Т-клеток при одновременном увеличении количества Т-клеток памяти, что указывает на преждевременную инволюцию тимуса. Ожирение ускоряет возрастную инволюцию тимуса на нескольких уровнях, включающих

повышенный апоптоз развивающихся тимоцитов, снижение пула предшественников Т-клеток и сокращение числа недавних эмигрантов тимуса (recent thymic emigrants – RTE) [140, 141].

Van der Weerd и соавт. (2012) обнаружили селективное увеличение CD4⁺Т-клеток в периферической крови у тучных людей, тогда как количество CD8⁺Т-клетки было нормальным при сниженном содержании TREС, а также выявили положительную корреляцию количества CD4⁺Т-клеток с уровнем инсулина натощак. Это связано с повышенной гомеостатической пролиферацией Т-клеток, которой могут способствовать повышенные плазменные уровни цитокинов – IL-7 и CCL5 [142].

Кроме того, в недавнем исследовании у лиц с ожирением выявлены значительные обратные корреляции между количеством TREС и некоторыми показателями ожирения (ИМТ, HbA1c), сывороточным уровнем С-реактивного белка, а развитие СД2 также было связано с меньшим количеством TREС [143].

В работе Трушиной Э.Н. и соавт. (2012) у больных СД2 и ожирением выявлено повышение величины иммунорегуляторного индекса (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺>2) вследствие снижения относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, что является неблагоприятным фактором в прогнозе развития заболеваний. Также обнаружено повышение содержания активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺), прямая корреляция повышенного содержания НКТ-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) в периферической крови больных СД2 с содержанием триглицеридов. Кроме того, зарегистрированное повышение количества лимфоцитов, экспрессирующих антиген CD95, свидетельствовало о более выраженной проапоптотической активности у больных СД2, чем у здоровых и у больных ожирением [144].

У больных СД2, ассоциированного с артериальной гипертензией, выявлен дисбаланс в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток, который тесно взаимосвязан с инсулинорезистентностью и неудовлетворительным контролем гликемии [145].

Вышеуказанные результаты исследования свидетельствуют о негативном влиянии сахарного диабета на иммунную систему, а именно на функцию Т-клеток.

1.3 Значение эмиграции Т-клеток из тимуса в иммунном надзоре

1.3.1 Роль тимуса в иммунной системе

Как известно, понятие иммунного надзора включает цепь событий, происходящих в иммунной системе, от распознавания антигена чужеродной клетки Т-клеточным рецептором до формирования иммунного ответа, направленного на элиминацию этой клетки. Тимус, центральный орган иммуногенеза, является производителем Т-клеток – основных функционеров иммунного надзора. Он обеспечивает уникальную микросреду для развития и созревания Т-лимфоцитов [146]. Ключевые события в течение развития Т-клеток включают переход предшественников лимфоидных клеток из костного мозга в тимус и их дифференцировка в Т-клетки-предшественники; формирование функционального Т-клеточного рецептора (Т-cell receptor–TCR) путем реаранжировки генов α и β цепи TCR; позитивная и негативная селекции

тимоцитов, обеспечивающие ограничения главного комплекса гистосовместимости МНС (Major Histocompatibility Complex – МНС) к собственным пептидам, а так же к аутореактивным клеткам пептидов [147-150]. После строго регулируемого процесса развития в тимусе Т-клетки, называемые недавними эмигрантами тимуса (RTE), способны покинуть его и присоединиться к пулу периферических Т-лимфоцитов. Процесс эмиграции RTE из тимуса называется тимическим выбросом или экспортом (thymic output) [151, 152].

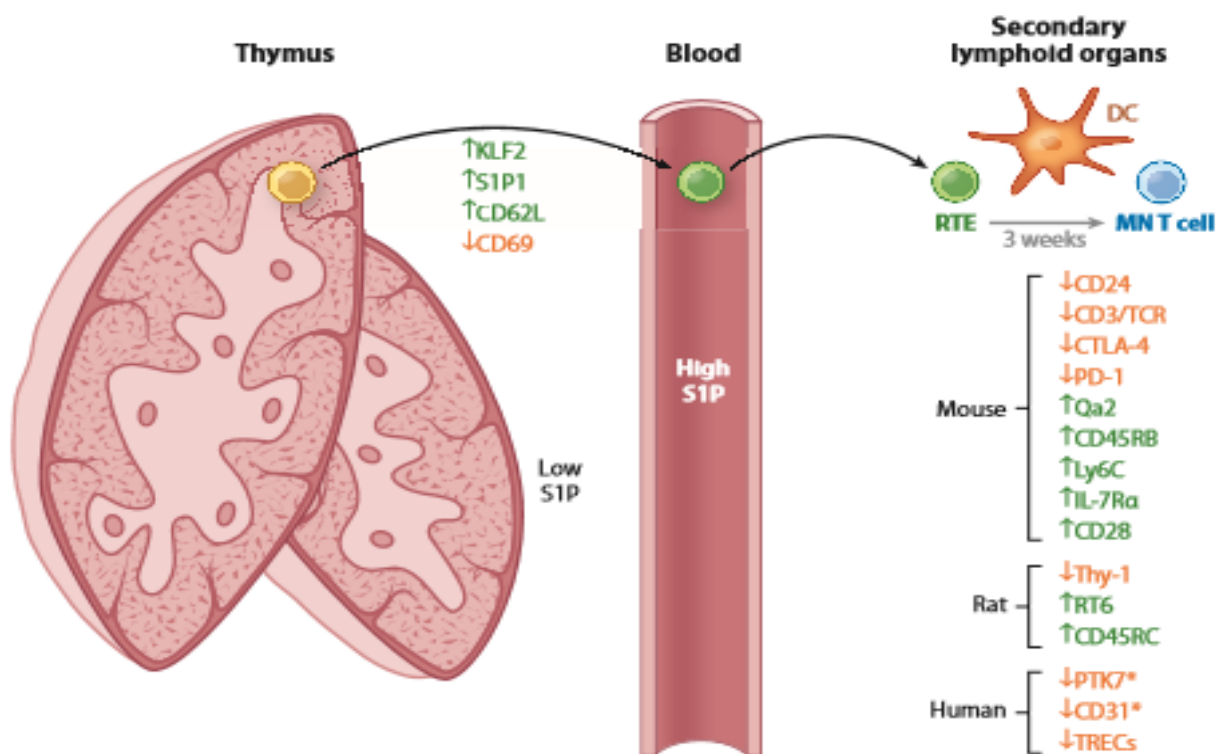
Следует отметить, что по сравнению с ранними стадиями развития тимоцитов, где детальный процесс их развития и основные механизмы достаточно хорошо исследованы, изучению поздних стадий развития Т-клеток, в частности тимический выброс и посттимическое созревание RTE, было уделено мало внимания.

Недавние эмигранты тимуса (RTE) составляют самую молодую популяцию Т-клеток, которые последними завершили внутритимусное развитие, эмигрировали на периферию и подверглись только нескольким клеточным делениям. Исследования последних лет показали, что они составляют фенотипически и функционально отличное от других подмножество Т-клеток. Первоначальный фенотип RTE – CD24⁺Qa2⁻CD45RB⁻IL-7R⁻TCR-CD3⁺CD28⁻, по окончании 3-х недель на их поверхности ослабляется экспрессия CD24/HAS, усиливается экспрессия молекул Qa2, CD28, CD127, на CD8⁺ RTE усиливается экспрессия CD62L, а экспрессия CD44 остается без изменений [153]. Эти фенотипические изменения, происходящие после выхода из тимуса, являются результатом созревания, а не селективного выживания и прогрессивного роста небольшой популяции RTE, несущих зрелый фенотип с самого начала. Кроме того, существует четкая корреляция между функциональным созреванием, измеряемой уровнем продукции IL-2 и TNF- α , и фенотипическим созреванием, измеряемой подавлением экспрессии CD24 и активацией экспрессии CD45RB и Qa2 [154]. Следует отметить, что полное фенотипическое созревание требует экспорта этих клеток из тимуса, хотя имеются данные о некоторых изменениях фенотипа поверхностных антигенов, ассоциированных с созреванием, которые могут происходить и в зрелых тимоцитах в тимусе [155, 156]. После того, как клетки покинули тимус, для дальнейшего функционального и фенотипического созревания требуется доступ к вторичным лимфоидным тканям. RTE не созревают у животных со спленэктомией, обработанных anti-VLA-4 (very late antigen 4) и anti-CD62L [154, p. 5215]. У людей фиброз лимфатической ткани может способствовать к медленному и часто неполному восстановлению фракции наивных Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов после окончания высокоактивной антиретровирусной терапии [157]. Следовательно, необходимость в здоровой структуре вторичных лимфоидных тканей для содействия созреванию RTE может распространяться также и на людей. RTE присоединяются к пулу зрелых Т-клеток только после периода посттимического созревания.

Понимание уникальных свойств RTE имеет решающее значение для прогнозирования иммунных ответов у новорожденных, пожилых и лиц, у

которых нарушение в популяции RTE играет патологическую роль в прогрессировании заболеваний (ВИЧ-инфекции, лейкозы, онкологические новообразования, хронический неспецифический язвенный колит и др.) [158]. Ранние исследования показали, что одно-положительные тимоциты являются «полностью зрелыми» и могут покинуть тимус случайно или «один за другим, в порядке очереди» (first-in-first out) [159]. Однако последние исследования продемонстрировали динамичную и сложную программу развития RTE в тимусе и на периферии. Кроме того, миграция этих молодых Т-клеток из тимуса на периферию также строго регулируется [160].

Эмиграция Т-клеток из тимуса начинается с момента исчезновения с их поверхности молекулы CD69, что является признаком завершения процессов селекции, которые происходят через сигнализацию TCR. В мозговом слое тимуса примерно через 2 дня после позитивной селекции одно-положительные (simple-positive) клетки, готовые к эмиграции, активируют Krüppel-like Factor 2 – KLF2 [161], являющийся транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию рецептора сфингозин-1-фосфата (Sphingosine-1-phosphatereceptor 1 –S1P1) и CD62L [162, 163]. Благодаря градиенту S1P1 зрелые тимоциты следуют в кортико-медулярную зону, частично окруженные кровеносными сосудами (рисунок 1).



Желтые клетки (CD69^{hi}TCR^{hi}) – одно-положительные тимоциты; зеленые клетки – последние эмигранты тимуса; синие клетки – зрелые наивные Т-клетки; thymus – вилочковая железа (тимус); blood – кровь; secondary lymphoid organs – вторичные лимфоидные органы; mouse – мышь; rat – крыса; human – человек; low – низкий; high – высокий

Рисунок 1 – Схема созревания и выброса из тимуса во вторичные лимфоидные органы

Примечание – Составлено по источнику [158, p. 37]

Тимоциты попадают в сосудистое русло двумя путями: через эндотелий посткапиллярных венул и через афферентную лимфу, при этом трансмиграция через сосудистый эндотелий занимает примерно 3 минуты [152, p. 1132]. У молодых взрослых мышей благодаря этому процессу примерно один миллион RTE ежедневно покидают тимус [164, 165]. Количество ежедневной продукции RTE у 20-25 летних людей составляет $1,7-17 \times 10^7$ [166, 167].

Тимус подвергается инволюции в процессе старения и беременности, что влияет на количество как созревающих тимоцитов, так и RTE [168, 169]. Инволюция тимуса коррелирует со стрессом, производством воспалительных цитокинов, повышенным уровнем половых гормонов и сниженной экспрессии Foxp 1 и фактором роста кератиноцитов [170]. Однако установлено, что выход RTE из тимуса в молодом и пожилом возрасте происходит с одинаковой скоростью, примерно 1-2% тимоцитов в день [171, 172]. Тимус может функционировать даже в преклонном возрасте, что вызвало возобновление интереса к изучению функции тимуса людей [173]. Другие исследования пришли к заключению, что либо экстратимические события не влияют на эффективность тимического выброса, либо поколение RTE, являющиеся кандидатами для эмиграции, является лимитом в процессе генерации RTE. Последняя гипотеза кажется более вероятной, учитывая трехнедельный срок созревания тимоцитов [174].

1.3.2 Вклад тимического выброса в поддержании периферического Т-клеточного пула

Тимический выброс и периферический гомеостаз поддерживают численность наивных Т-клеток в течение всей жизни [175]. До недавнего времени считалось, что тимический экспорт у людей при сравнении с экспериментальными животными в меньшей степени участвует в поддержании разнообразия Т-клеточного репертуара, чем периферическая пролиферация Т-клеток. Однако значимость тимического выброса, была в позднее оценена в условиях Т-клеточного истощения у разных категорий больных [176-179], у пациентов после трансплантации почек (как у детей, так и у взрослых) посредством подсчета CD31-положительных RTE [180].

В работе Bloemers и соавт. (2011) подтверждено, что у детей с синдромом Дауна отмечается сниженное количество наивных Т-клеток и аномалии развития и функции тимуса. При этом установлено, что за снижение популяции периферических наивных Т-клеток ответственен именно тимический выброс, а не периферическая пролиферация наивных Т-клеток, подтверждая это низким содержанием Т-рецепторных эксцизионных колец (T-cell receptor excision circles – TRECs) и протеин тирозинкиназы–7 (Protein tyrosine kinase 7 – PTK7) – положительных RTE [181].

Тимический выброс хорошо коррелирует с повышенной выживаемостью и снижением случаев инфекционных осложнений у молодых взрослых реципиентов после аллогенной трансплантации стволовых клеток [182-185]. Обнаружение RTE у больных с рассеянным склерозом после

аутотрансплантации стволовых клеток также свидетельствует о расширении репертуара наивных Т-клеток [186].

У молодых людей, перенесших тимэктомию в детстве при кардиохирургической терапии, отмечались признаки преждевременного старения иммунной системы, включающие сниженное количество Т-клеток, особенно популяции наивных клеток, а также повышения пула олигоклональных Т-клеток памяти [187]. Считается, что преждевременное угнетение тимического выброса может быть толчком для развития ревматоидного артрита благодаря компенсаторной индукции гомеостатической пролиферации и клональной экспансии Т-клеток, приводящее к аутореактивному Т-клеточному репертуару [188].

Значение RTE хорошо продемонстрировано при изучении больных ВИЧ-инфекцией. Установлено, что ВИЧ-инфицированные лица, которые контролировали свою инфекцию, имели более высокий уровень TREC-содержащих Т-клеток, чем те, у которых болезнь прогрессировала к СПИДу [189, 190]. Кроме того, успешное восстановление иммунной системы у пациентов, завершивших высокоактивную антиретровирусную терапию, также зависело от интенсивности тимического выброса [191, 192]. В тоже время интерпретацию результатов при этой патологии осложняет факт, что тимический выброс уменьшается при ВИЧ-инфекции [193], а RTE в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток сама восприимчива к ВИЧ-инфекции [194].

1.3.3 Идентификация недавних эмигрантов тимуса

В процессе совершенствования методов определения RTE, как популяции, отличной от других видов периферических Т-клеток, расширяются наши представления о биологии RTE.

1.3.3.1 Определение недавних эмигрантов тимуса у экспериментальных животных

Впервые RTE у мышей были идентифицированы более 30 лет назад путем прямой инъекции флуоресцеина изотиоцианата (Fluorescein isothiocyanate – FITC) в тимус и определения FITC-положительных периферических Т-клеток по истечении 18-24 часов методом проточной цитометрии [195]. Эта революционная процедура позволила провести фенотипический и функциональный анализ самых молодых RTE, тем самым установив разницу между ними и более «старшими» периферическими Т-клетками. К недостаткам этого метода относятся хирургический стресс, который потенцирует изменение измеряемых параметров, короткий период полураспада FITC и, как следствие, малое количество анализируемых клеток, а также неспецифическая маркировка зрелых Т-клеток с рециркуляцией в тимус [196].

Другой метод определения RTE у животных основан на введении им бромдезоксипуредина (Bromodeoxyuridine – BrdU), поглощаемый делящимися тимоцитами, которые были определены как RTE. Однако периферические Т-клетки также поглощали этот агент, в связи с чем идентифицировать RTE было проблематичным [197].

Еще один метод связан с введением гена GFP (green fluorescent protein-GFP) трансгенным мышам линий RAG1-GFP и RAG2p-GFP Tag. У этих мышей сигнал GFP можно обнаружить даже после отсутствия экспрессии гена RAG, являющийся промотором экспрессии GFP, то есть клетки GFP⁺ являются RTE, которые можно обнаружить в течение нескольких недель [198, 199]. Кроме того, по интенсивности флюоресценции можно определить возраст RTE. Этот метод применяется и в настоящее время, но его ограничения связаны с использованием только одной трансгенной линии животных и невозможностью его применения у людей [200].

Также RTE идентифицируется в генетически менее податливых животных системах (крысы, куры, овцы, свиньи). Так, у цыплят определялась экспрессия поверхностного антигена ChT₁, характерного для RTE субпопуляций CD4 и CD8 [201].

1.3.3.2 Определение недавних эмигрантов тимуса у людей. Метод определения T-рецепторных эксцизионных колец.

К сожалению, на сегодняшний день для идентификации RTE не установлены надежные маркеры. Специалистами выявлены мембранные маркеры лишь в отдельных субпопуляциях T-лимфоцитов (CD4⁺ или CD8⁺) у людей. Так, в качестве маркера CD4⁺ RTE используются молекула адгезии CD31, участвующая в миграции лейкоцитов между клетками сосудистого эндотелия [202-204], а также внутриклеточный фермент протеинтирозинкиназа-7 (Protein tyrosine kinase 7 – РТК7), экспрессия которого по мере созревания тимоцитов убывает, в связи с чем, содержание РТК7-положительных RTE в субпопуляции CD4⁺ T-клеток в периферической крови составляет всего 10% [205]. Маркером для RTE субпопуляции CD8⁺ T-клеток считается молекула CD103 [206]. Хотя эти методы основаны на фенотипической и функциональной идентификации RTE, широкое применение этих методов ограничивает неоднозначная связь специфических для разных субпопуляций мембранных маркеров с фракцией RTE [203, p. 774].

Хорошим показателем уровня RTE у людей является определение содержания T-рецепторных эксцизионных колец – (T-cell receptor excision circles – TREC) [207-209]. Определение концентрации TREC является наиболее доступным и малоинвазивным методом в диагностике, мониторинге и прогнозировании. В основу этого метода положена реаранжировка V-генов T-клеточного рецептора.

Как известно, благодаря наличию T-клеточного рецептора (TCR) на поверхности T-лимфоцитов происходит распознавание антигена. Существуют две разновидности TCR: тип TCR- $\alpha\beta$ (гетеродимеры α - и β -цепей) экспрессируются 90% T-лимфоцитов, менее 10% T-клеток экспрессируют на своей поверхности TCR- $\gamma\delta$ (гетеродимеры γ - и δ - цепей). У человека выявлено 4 генетических кластера, определяющих формирование различных цепей TCR, которые имеют различную хромосомную локализацию. Кластеры α - и δ -цепей локализованы в 14-й хромосоме, в то время как, формирование структуры β - и

γ -цепей локализованы в 7-й хромосоме. Каждая из четырех цепей состоит из переменных (V) и константных (C) доменов [210].

При дифференцировке лимфоцитов в тимусе происходит процесс, необходимый для формирования антигенраспознающего рецептора, который называется реарранжировкой (перестройкой) гена T-клеточного рецептора. Реарранжировка генов рецепторов лимфоцитов начинается с экспрессии генов V(D)J-рекомбинационного комплекса под влиянием дифференцировочных стимулов, экспрессией генов RAG, кодирующих димерные экзонуклеазы RAG-1 и RAG-2. Этот процесс заключается в сближении случайных сегментов ДНК после их двойных разрывов с дальнейшей сшивкой этих сегментов и формированием зрелого V-гена. Сначала при наличии сегмента D происходит перестройка на участке между D- и J-сегментами с формированием DJ. Далее с помощью рекомбинационных сигнальных последовательностей (RSS – Recombination signal sequences) перестройка захватывает участок между V- и DJ-сегментами. Вырезанный отрезок, содержащий RSS, замыкается путем соединения разорванных нитей, формируя кольцо, которое и является TREC [176, p. 692] (рисунок 2).

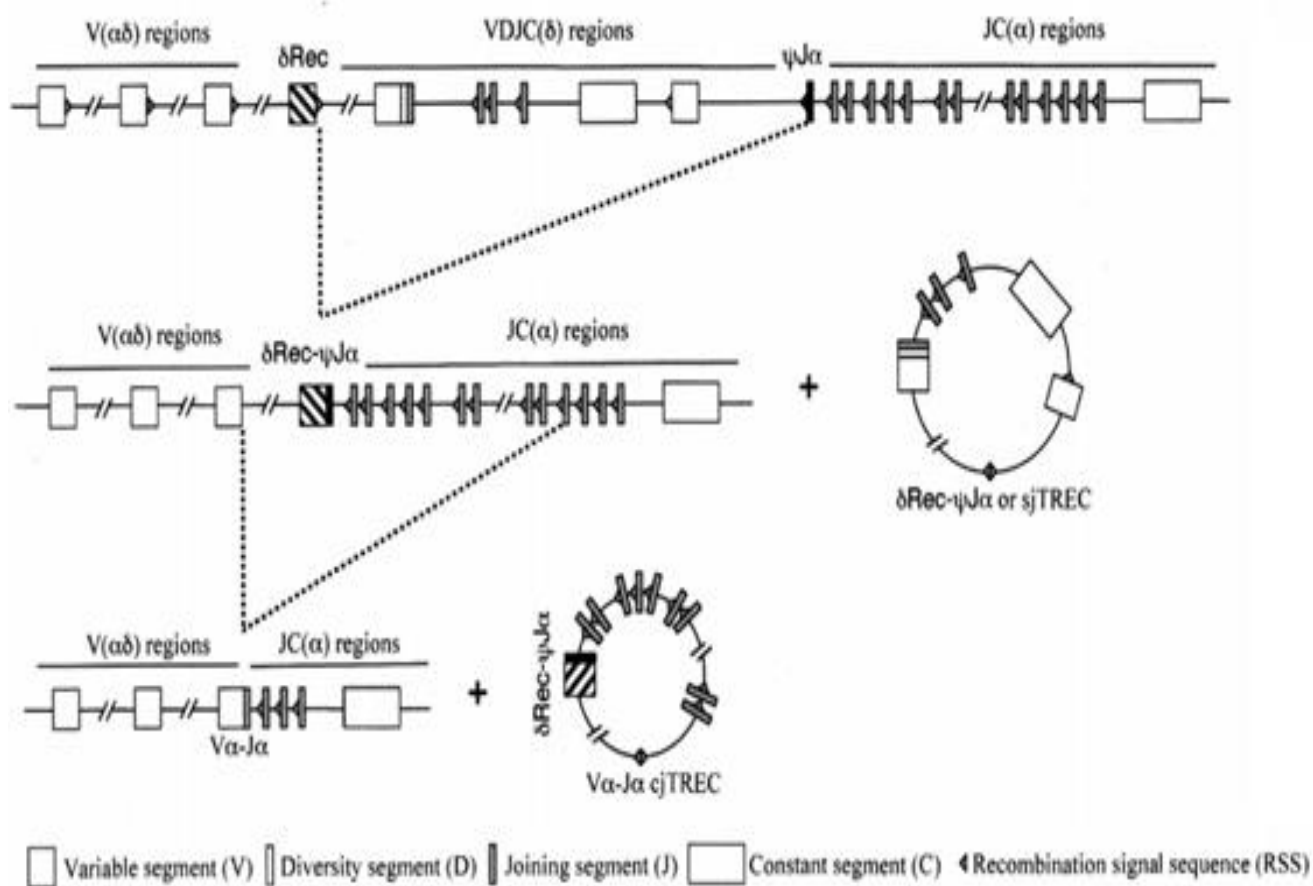


Рисунок 2 – Реарранжировка генов TCR и формирование TREC

Вырезанные и замкнутые в кольцо фрагменты ДНК (TREC) во время реарранжировки генов TCR сохраняются в клетках эписомально. В ходе первой реарранжировки гена TCR α происходит удаление локуса TCR δ из локуса

TCR α , формируя два вида TREC: sjTREC (signal-joint) и cjTREC (coding-joint), которые можно определить в зрелых $\alpha\beta$ Т-клетках. Если реарранжировка происходит в обоих аллелях, то максимум два sjTREC и два cjTREC могут присутствовать в одной $\alpha\beta$ Т-клетке. Затем TREC покидают тимус в составе RTE, таким образом, уровень TREC на периферии может отражать число RTE. Следует отметить, что TREC являются стабильными структурами и не дублируются во время митоза в отличие от генов TCR, поэтому их концентрация разбавляется с каждым делением клетки [176, p. 693]. Это объясняет, что наивные клетки имеют значительно высокие концентрации TREC, чем Т-клетки памяти.

Как было сказано выше, сближение сегментов будущих TREC осуществляется путем взаимного распознавания RSS расположенных между сближаемыми сегментами, то есть в составе TREC находятся последовательности RSS. Эти последовательности отсутствуют в других клетках организма, при этом последовательность сегмента RSS в составе TREC обратно последовательности в неперестроенном гене. Эта особенность и дает возможность определять TREC с помощью полимеразной цепной реакции [211].

Измерение концентрации TREC, как иммунологический мониторинг, успешно используется при различных патологиях.

Анализ TREC в ранние сроки после трансплантации стволовых клеток создаёт возможность выявить пациентов с дефицитом Т-клеток на ранней стадии и тем самым предупредить развитие инфекционных осложнений, а также в некоторых случаях является важным фактором в решении вопроса о ретрансплантации или увеличении донорских стволовых клеток [212]. Sairafi D. и соавт. (2012) поддерживают использование анализа TREC в качестве стандартного параметра после трансплантации. Выявлено, что у пациентов с высоким уровнем TREC через 3 месяца после трансплантации отмечается высокая степень выживаемости [213].

Результаты нескольких исследований показали роль функции тимуса в контексте трансплантации стволовых клеток, являющейся общей стратегией лечения онкогематологических больных и других видов заболеваний крови [214].

Показано, что восстановление уровня TREC после миелоаблативного кондиционирования связано с восстановлением нормального состава наивных Т-клеток и разнообразия TCR [215].

Определение содержания TREC стало эффективным инструментом и в диагностике иммунодефицитов [216]. Наиболее серьёзным видом является тяжелый комбинированный иммунодефицит SCID (Severe Combined Immunodeficiency), который характеризуется нарушением развития Т-лимфоцитов. По мнению Adeli M.M. и соавт. (2010) при любом абсолютном снижении лимфоцитов ниже 2500/ml, считающимся потенциально патогенным в раннем детстве, младенец должен быть обследован для исключения SCID [217]. Важными преимуществами использования метода определения TREC для скрининга новорождённых с SCID являются

способность использования сухой капли крови, низкая стоимость, высокая пропускная способность и высокая чувствительность [218]. В диагностике SCID специфичность анализа TREC составила 92,3%, а чувствительность 100% [219]. В крупном исследовании 5766 новорожденных пациентов с SCID было указано, что измерение TREC является стабильным анализом, который может определить Т-клеточную лимфопению в крови. Так, в 2008 году TREC был впервые адаптирован к использованию в программе скрининга новорождённых SCID штата Висконсин, США [220].

Многочисленные данные подтверждают, что уровень TREC является полезным маркером функции тимуса и у ВИЧ-1-инфицированных лиц как для диагностики, так для оценки эффективности антиретровирусной терапии [207, с. 15; 208, р. 517; 209, р. 166]. ВИЧ-инфекция поражает как зрелые CD4⁺ Т-клетки, так и CD4⁺ тимоциты [221]. При хроническом течении заболевания число CD4⁺ Т-клеток постепенно снижается, что приводит к состоянию иммунодефицита (СПИД). Однако уровни TREC среди пациентов изменчивы и в начальной стадии инфекции по сравнению со здоровыми людьми, разница может не наблюдаться. Мониторинг тимического выброса по уровню TREC был также использован для изучения восстановления иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов после терапии малых доз длительного рекомбинантного человеческого гормона роста, после которой наблюдалась стимуляция тимопоэза и частичное восстановление функции тимуса [222].

Однако необходимо акцентировать, что количество TREC в популяции периферических Т-клеток является показателем не только тимического выброса, но и отражает пролиферацию и апоптоз Т-клеток [223], что следует учитывать при интерпретации результатов в процессе исследования. Кроме того, анализ конкретных субпопуляций Т-клеток при использовании данного метода невозможен.

1.4 Значение интерлейкина-7 для Т-клеток

Интерлейкин-7 (IL-7) представляет собой цитокин, имеющий важное значение для адаптивной иммунной системы. IL-7, в основном, производится некроветворными клетками, включая кератиноциты в коже, фибробластов стромальных клеток в лимфоидных органах – костном мозге [224] и эпителиальных клетках тимуса [225]. Путем активации внутриклеточных сигнальных путей IL-7 способствует выживанию и пролиферации наивных клеток и Т-клеток памяти, а также RTE [226-228]. Кроме того, IL-7 играет важную роль для гомеостаза Т-клеток и пролиферации при лимфопении [229]. Следовательно, IL-7 является идеальной мишенью для коррекции функции иммунной системы. Он может восстановить иммунную систему [230, 231], улучшить функцию Т-клеток *in vivo* и противодействовать иммуносупрессивным факторам, что позволило применение этого цитокина в качестве иммунотерапии для лечения онкологических заболеваний [232].

Рецептор IL-7 (IL-7R) является гетеродимером, состоящий из двух цепей: α-цепи – CD127 или IL-7Rα, которая специфически связывается с IL-7 и

экспрессируется лимфоцитами, и γ -цепи – CD132, общей для рецепторов к семейству цитокинов I типа (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21) и экспрессируемых на всех кроветворных клетках [233]. Нарушение в системе IL-7/IL-7R приводит к резкому снижению выживаемости периферических Т-клеток *in vitro* [234, 235] и к тяжелым комбинированным иммунодефицитам *in vivo* [236-239].

Существуют два основных пути сигнализации IL-7: Jak-Stat и Akt-PI3K [240]. Связывание IL-7 с рецептором IL-7R вызывает активацию ферментов Jak (протеинтирозинкиназы) в цитозоле, фосфорилирование сигнального трансдуктора и активатора транскрипции белков (STAT), которые впоследствии транслоцируются в ядро клеток, чтобы активировать экспрессию генов. Таким образом, IL-7 активирует анти-апоптотические гены – Bcl-2 и Mcl-1 и подавляет проапоптотические белки, такие как Bax и Bak. Этот эффект IL-7 дозозависимый: более высокая концентрация IL-7 индуцирует пролиферацию эмигрантов тимуса, в то время как более низкие концентрации поддерживают выживание клеток [241]. При активации PI3K-Akt пути IL-7 подавляет ингибитор клеточного цикла p27^{Kip1}, индуцируя экспрессию циклина D1 для прогрессирования клеточного цикла [242].

Защита организма от чужеродных агентов иммунной системой зависит от размера пула Т-лимфоцитов. Этот пул поддерживается в динамическом равновесии. Антигенспецифические Т-клетки выполняют свою миссию, а затем умирают, тогда новые Т-клетки (недавние эмигранты тимуса) дополняют этот бассейн. IL-7 сохраняет этот баланс в трех направлениях: тимопоз, гомеостатическая пролиферация и жизнеобеспечение.

Sasson S.C. и соавт. (2006) при изучении иммунного статуса у ВИЧ-1-инфицированных пациентов описали новые фенотипы Т-клеток на основе экспрессии компонентов IL-7R, как CD127⁺CD132⁻, CD127⁺CD132⁺ и CD127⁻CD132⁺, и пришли к выводу, что ВИЧ-инфекция была связана с потерей CD127⁺CD132⁻ Т-клеток и реципрокным увеличением CD127⁻CD132⁺ Т-клеток в CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляциях. Эти изменения наблюдались при первичной ВИЧ-инфекции, стали более выраженными при хроническом течении заболевания и оставались такими же после 10 месяцев антиретровирусной терапии [13, p. 513].

В более последних своих работах авторы изучали эти фенотипы в состояниях созревания, активации, пролиферации и выживания, а также обнаружения ДНК-маркеров RTE, констатируя, что в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ у здоровых и ВИЧ-инфицированных лиц CD127⁺CD132⁻ Т-клетки, лишенные маркеров активации, являются недавними эмигрантами тимуса (RTE), которые после начала активации антигенами прогрессируют во фракцию CD127⁺CD132⁺, называемую типичными эмигрантами, а Т-клетки с фенотипом CD127⁻CD132⁺ относятся к окончательно-дифференцированным клеткам [243]. Схема дифференцировки эмигрантов тимуса представлена в рисунке 3.

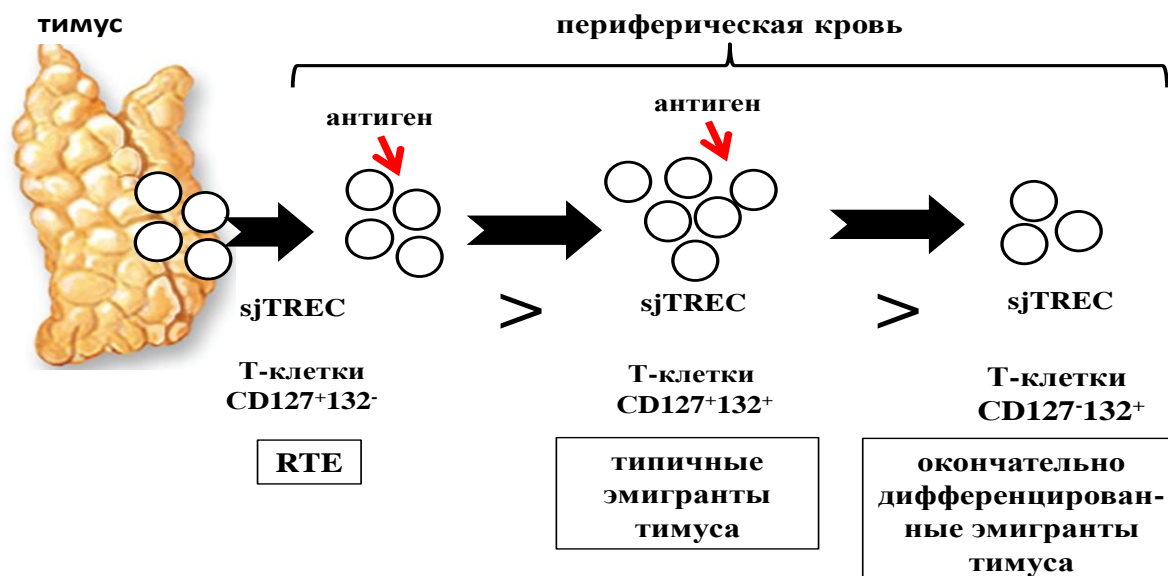


Рисунок 3 – Схема дифференцировки эмигрантов тимуса у людей и их идентификация

Примечание – Модифицирована авторами [243]

1.5 Эффекты метформина в контексте сахарного диабета, злокачественных опухолей и Т-клеток

Метформин (1,1-dimethylbiguanide) в настоящее время является препаратом первой линии терапии сахарного диабета 2 типа (СД2) [19, р. 200]. Метформин является одним из наиболее часто назначаемых препаратов в мире, который прописывают ежегодно по меньшей мере 120 миллионам человек во всем мире [21, р. 3576]. Этому признанию предшествовали результаты многоцентрового рандомизированного контролируемого клинического исследования различных видов терапии СД2 – the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) [244].

Многолетняя клиническая практика применения метформина у пациентов с СД2 показала, что препарат, обладает множеством плейотропных эффектов: оказывает антитромботические, противовоспалительные, антиоксидантные эффекты; положительно воздействует на липидный профиль, эндотелиальную дисфункцию и др. [22, с. 40]. В дополнение к его использованию при сахарном диабете, метформин является также эффективным в лечении синдрома поликистозных яичников [23, р. 192], а также изучается в качестве противовирусного и противоракового агента [24, р. 307].

Документально подтверждена антиканцерогенная активность метформина как у больных сахарным диабетом, так и у недиабетических больных с неоплазмами.

1.5.1 Молекулярный механизм гипогликемического действия метформина

Механизм действия метформина как антигипергликемического агента достаточно широко изучен. Его плодотворное влияние на концентрацию глюкозы в крови является результатом сложных многофакторных механизмов, включающих ингибирование глюконеогенеза в печени, приводящие к снижению выброса глюкозы [245-247], улучшению чувствительности к инсулину, уменьшению всасывания глюкозы в тонком кишечнике [248]; поглощению глюкозы скелетными мышцами и белыми адипоцитами [249, 250].

Хотя точный механизм, с помощью которого метформин действует на молекулярном уровне, остается неизвестным, было показано, что первичная цель препарата – это комплекс 1 митохондриальной дыхательной цепи. После его внутриклеточного транспорта в печени с помощью органических катионных транспортеров (organic cation transporter 1 – OCT1) метформин оказывает специфическое ингибирование комплекса 1 дыхательной цепи. Это уникальное свойство препарата вызывает уменьшение окисления NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide), что приводит к снижению АТФ из АДФ и неорганического фосфата, результатом которого является активация аденозинфосфаткиназы – АМРК (AMP-activated proteinkinase), играющая основную роль в энергетическом балансе клетки [251-253]. Кроме того, снижение глюкозы метформином обусловлено его способностью подавлять глюконеогенез в печени через сигнальный путь от печеночной киназы В1 – LKB1 (liver kinase B1) [254].

Вместе с тем, Foretz M. и соавт. (2010) показали, что метформин ингибирует глюконеогенез через LKB1- и АМРК-независимые пути. Метформин-индуцированное ингибирование продукции глюкозы происходит за счет регулирования потока глюконеогенеза, а не прямого ингибирования экспрессии глюконеогена. Кроме того, выявлено, что контроль продукции глюкозы в печени метформином связан с ингибированием глюконеогенеза в ответ на уменьшение энергетического состояния в печени [255]. Таким образом, вышесказанные пути снижения энергетического статуса приводят к острому и транзиторному ингибированию энергоемких глюконеогенных путей. Кроме того, метформин может привести к ингибированию продукции глюкозы через АМРК-зависимые и АМРК-независимые регулирующие механизмы, нарушая экспрессию генов глюконеогенеза [252, p. 265].

Параллельно с этим LKB1-зависимая активация АМРК, вызванная истощением АТФ, может привести к ингибированию липогенеза путем индуцирования фосфорилирования и инактивации ацетил-КоА карбоксилазы, ключевого энзима, регулирующего синтез малонил-КоА, являющийся прекурсором биосинтеза жирных кислот и мощным ингибитором окисления митохондриальных жирных кислот. Эти эффекты, по-видимому, вносят свой вклад в способность метформина *in vivo* снижать уровень триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности в крови [256].

1.5.2 Потенциальный механизм противоопухолевого действия метформина

Как известно, метаболизм играет важную роль в развитии и прогрессии злокачественных новообразований. Раковые клетки, по сути, используют глюкозу для генерации АТФ и синтеза макромолекул, в то время как метформин прямо модулирует «хранителя» метаболического гомеостаза – АМРК [257]. Следует отметить, что механизмы противоопухолевого действия метформина до конца не ясны.

Как было уже сказано, метформин относится к числу активаторов АМРК. Этот фермент входит в число ключевых регуляторов клеточного метаболизма и энергетики и является мишенью гена-супрессора LKB-1, утрата или мутация которого сопряжена с развитием синдрома Peutz-Jeghers (гастроинтестинальные полипы, пигментация кожи и слизистых), а также имеет отношение к возникновению рака молочной железы и некоторых других опухолей [258]. АМРК активируется при уменьшении энергетических запасов клетки или физической нагрузке. Активация АМРК связана с угнетением клеточной пролиферации при участии оси p53-p21 и циклинзависимых киназ, что приводит к остановке клеточного цикла на стадии G1, синтеза белка (мишень mTOR) и гликолиза, что объясняет тормозящий эффект метформина на опухолевый рост. Активация АМРК возможна также посредством фосфорилирования треонинового остатка в α -субъединице энзима, за которое ответственен супрессор опухолевого роста – LKB1 [7, p. 1117].

Предполагаются два основных механизма противоопухолевого эффекта метформина:

- а) прямой – инсулиннезависимый;
- б) непрямой – инсулинозависимый (рисунок 4).

Инсулинозависимый, непрямой эффект метформина связан со способностью ингибировать транскрипцию ключевых генов глюконеогенеза в печени и стимулировать поглощение глюкозы в мышцах, тем самым уменьшая уровни глюкозы в крови натощак и инсулина. Эффект снижения инсулина метформином может играть важную роль в противоопухолевой активности, так как инсулин имеет митогенные и пролиферативные эффекты и опухолевые клетки часто экспрессируют высокие уровни рецептора инсулина [16, p. e56662]. Кроме того, ожирение и высокие уровни инсулина являются неблагоприятными прогностическими факторами для ряда видов рака, особенно молочной железы, простаты и толстой кишки [70, p. 1838]. Таким образом, метформин может уменьшить негативные эффекты инсулина на развитие опухоли и роста. В экспериментальных исследованиях метформин подавлял стимулирующие эффекты ожирения и гиперинсулинемии на рост опухоли легких мышей путем повышения чувствительности к инсулину, снижения циркулирующего инсулина и активации АМРК [260]. Кроме того, метформин на 22% уменьшал циркулирующий уровень инсулина и на 25% улучшал чувствительность к инсулину среди женщин с раком молочной железы, не страдающих диабетом, выделяя тем самым метформин в качестве потенциального средства при лечении рака молочной железы [17, p. 815].

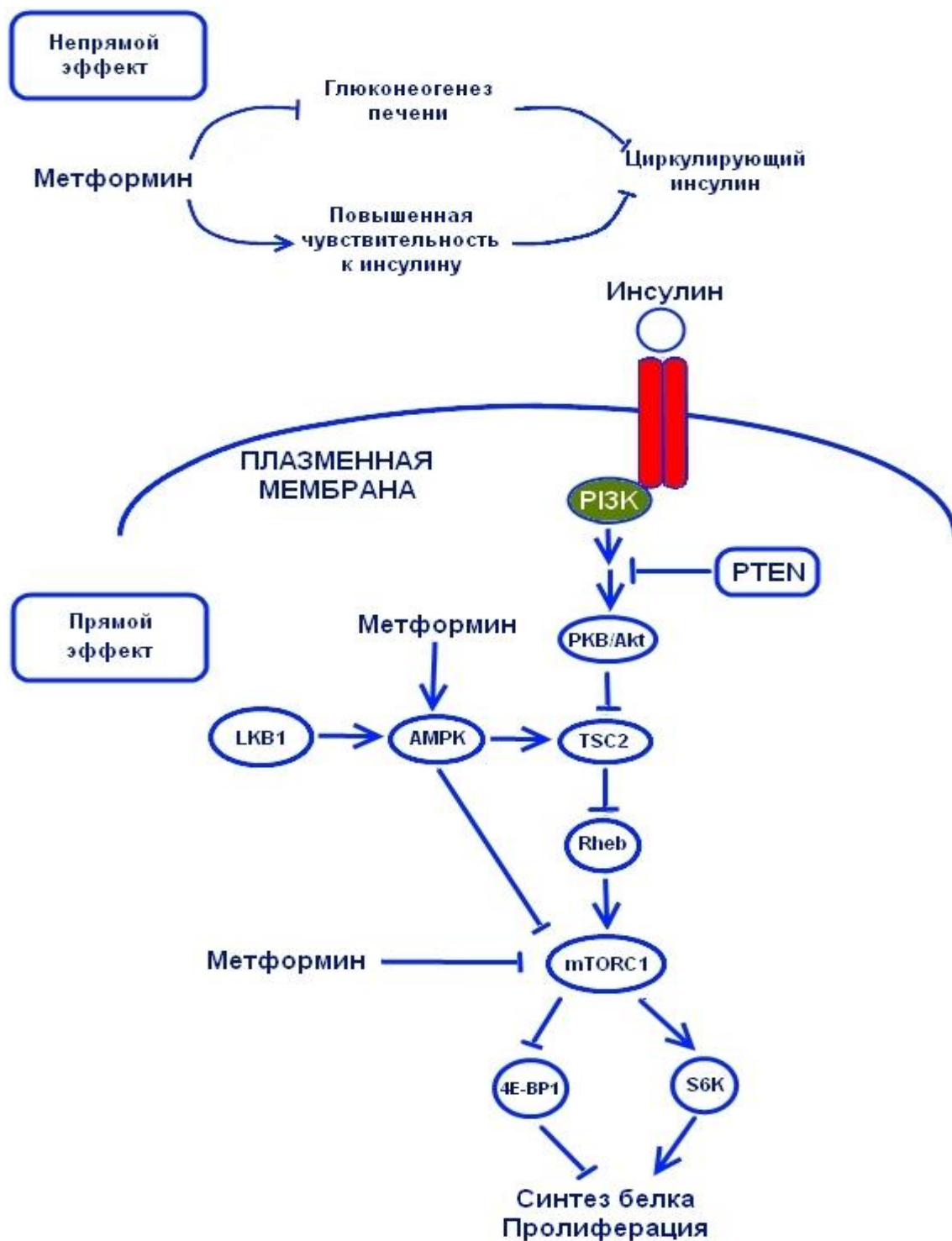


Рисунок 4 – Механизм антиканцерогенного действия метформина

Примечание – Составлено по источнику [259]

Инсулиннезависимый эффект метформина связан с активацией AMPK, которая блокирует сигнальный путь mTOR, ответственный за пролиферацию клеток многих опухолей [261]. AMPK воздействует на mTOR через фосфорилирование и активацию опухолевого супрессора туберина (tuberous sclerosis complex 2 – TSC2), который негативно влияет на деятельность mTOR [252, p. 268]. Установлено, что mTOR играет ключевую роль как фактор роста и

является важным медиатором сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы/протеинкиназы В/Akt (PI3K/PKB/Akt), который нередко считается нерегулируемым путем в злокачественных новообразованиях у людей [73, p. 847; 75, p. 1120]. Активация AMPK через метформин приводит к ингибированию передачи сигналов mTOR, снижению фосфорилирования основных эффекторов, таких как эукариотический фактор инициации 4E-связывающий белок (4E-бит), рибосомный белок S6 киназы (S6Ks), а также приводит к ингибированию глобального синтеза белка и пролиферации различных раковых клеток [27, p. 93].

Последние несколько лет все больше свидетельств показывают, что метформин оказывает противоопухолевый эффект через модуляцию микроРНК, семейство малых некодирующих РНК длиной примерно в 20-25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне [262-267]. МикроРНК являются ключевыми регуляторами многих биологических процессов, таких как клеточная пролиферация, дифференциация, апоптоз, стрессовые реакции и ангиогенез, поэтому любое нарушение регуляции экспрессии микроРНК может способствовать инициации различных патологий, в том числе и развитию неоплазм, выступая в роли онкогена или гена-супрессора опухолей [268].

Таким образом, многочисленные свидетельства указывают на противоопухолевую активность метформина, связанную с несколькими путями. Метформин оказывает свое действие через AMPK-зависимые или независимые механизмы, ведущие к ингибированию передачи сигналов mTOR и клеточного цикла путем уменьшения уровня циклина D1, стимуляции p53/p21 оси, синтеза жирных кислот, ангиогенез и воспаление, а также через модуляцию микроРНК [252, p. 270].

1.5.3 Действие метформина на Т-клетки

В последние годы появились единичные работы, демонстрирующие влияние метформина на Т-клетки, являющиеся ключевым звеном в иммунологическом надзоре, нормальное функционирование которого обеспечивает защиту от чужеродных агентов, в том числе и раковых клеток.

В регуляции дифференцировки Т-лимфоцитов немаловажную роль играет mTOR, так как он является своеобразным связующим звеном между метаболизмом и дифференцировкой Т-клеток. mTOR контролирует экспрессию цитолитических эффекторных молекул, хемокина и рецепторов адгезии эффекторных Т-клеток. Другим регулятором дифференцировки Т-клеток является AMPK, в активации которого участвует LKB1, имеющая важное значение для нормального развития и функционирования Т-клеток. Отсутствие LKB1 в Т-клетках выражается в нарушении клеточной пролиферации и жизнеспособности в ответ на метаболический стресс. В результате этого LKB1-дефицитные Т-клетки проводят дефектную пролиферацию в ответ на Т-клеточный рецептор и более чувствительны к апоптозу [269].

В исследовании на мышах Pearce E.L. и соавт. (2009) показано влияние метформина на генерацию Т-клеток памяти. Дефект окисления жирных

кислот в CD8⁺ Т-лимфоцитах является причиной невозможности ими генерировать Т-клетки памяти. Метформин восстанавливал как метаболический дефект, так и генерацию Т-клеток памяти [29, p. 103].

Прямое воздействие метформина на CD8⁺ Т-клеток приводит к ингибированию роста опухолей у мышей линий BALB/c, C57BL/6 и CB-17 SCID. Метформин защищает CD8⁺ опухоль-инфильтрирующие лимфоциты от апоптоза, и многофункциональность истощенных PD-1-Tim-3⁺ CD8⁺ – эффекторных клеток памяти, ответственных за отторжение опухолей, восстанавливаются с переходом от центральных Т-клеток памяти на фенотип эффекторных клеток памяти. Данный метформин-индуцированный противоопухолевый эффект связан с выраженными изменениями в характеристиках CD8⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в микросреде опухоли. Кроме того, показано, что комбинированное использование метформина и противораковой вакцины может повысить эффективность вакцины. Возможно, метформин способствует превращению центральных клеток памяти в эффекторные клетки памяти, которые активны в отношении опухолей [28, p. 1813].

Экспериментальное исследование Zargouk M. и соавт. (2014) показало, что метформин оказывает прямое воздействие на Т-клетки путем угнетения их бластогенеза и пролиферации. Он подавляет Т-клеточные ответы, блокируя ключевые метаболические изменения, вызванные взаимодействием антигена с Т-клеточным рецептором независимо от экспрессии АМПК в Т-клетках [270]. Метформин ингибирует сигнальные пути mTORC1 и предотвращает экспрессию факторов транскрипции c-Мус и HIF-1 α , контролирующей экспрессию транспортеров питательных веществ в Т-клетках [271].

В недавнем исследовании при анализе потенциального влияния метформина на субпопуляцию лимфоцитов, выявлено, что монотерапия метформином у больных СД2 оказывает влияние на состав субпопуляции лимфоцитов и на соотношение CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, а лечение в комбинации с инсулином ослабляет иммуномодулирующий эффект метформина [272].

Заслуживает внимания работа Green A.S. и соавт. (2010), показавшая, что метформин оказывает позитивное действие при острой миелоидной лейкемии. Метформин снижал набор молекул микроРНК, кодирующих онкогенные белки в полисомах, что привело к значительному антилейкемическому эффекту, активируя супрессор опухоли LKB1/АМПК/ТSC [30, p. 4273].

Таким образом, обзор научной литературы показывает, что в настоящее время проблема влияния сахарного диабета 2 типа и наиболее используемого антидиабетического препарата метформина на иммунный статус, а именно на тимический выброс, малоизучена. В связи с этим представляется целесообразным исследовать потенциальный иммуномодулирующий эффект метформина у больных сахарным диабетом 2 типа, проведя анализ эмиграции Т-клеток из тимуса, ответственных за разнообразие антигенраспознающего Т-рецепторного репертуара, играющего главную роль в распознавании чужеродных антигенов, в том числе и опухолевых.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика пациентов, участвовавших в исследовании

В исследование было включено 86 пациентов с сахарным диабетом 2 типа, диагноз установлен в соответствии с критериями Европейского кардиологического общества (European Society of Cardiology) и Европейской ассоциации изучения диабета (European Association for the Study of Diabetes) [273]. Все пациенты получали лечение в поликлиниках г. Познань, Польша. Разрешение для проведения всех исследований было получено от Локального этического комитета Медицинского университета имени Кароля Марцинковского г. Познань, Польша (Poznan Medical University of Medical Science, Poland). Все участники исследования дали информированное согласие.

Исследование проводили у 100 лиц:

I группа (n=44; 19 мужчин, 25 женщин) – МЕТ – больные сахарным диабетом 2 типа, получавшие монотерапию метформином (Glucophage®, Siofor®, от 500 до 3000 мг в день) не менее 6 месяцев;

II группа (n=24; 9 мужчин, 15 женщин) – ИНС+МЕТ – больные сахарным диабетом 2 типа, получавшие инсулин (Mixtard®, Gensulin®, Humulin®, Humalog®, NovoMix®) в комбинации с метформином не менее 6 месяцев;

III группа (n=18; 7 мужчин, 11 женщин) – БФЛ – больные сахарным диабетом 2 типа без фармакологического лечения;

IV группа (n=14; 8 мужчин, 6 женщин) – БСД – здоровые лица без сахарного диабета (контроль).

Другие виды медикаментозного лечения, такие как статины, ацетилсалициловая кислота в антитромбоцитарных дозах, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента или блокаторы рецепторов ангиотензина II, а также селективный бета-блокатор оставались неизменными у больных сахарным диабетом 2 типа в течение всего периода лечения метформином или инсулином в комбинации с метформином не менее 6 месяцев.

Критерием исключения для всех групп пациентов считали: наличие почечной или печеночной недостаточности, наличие острых или хронических инфекционных, воспалительных или злокачественных заболеваний. Данные о наличии или отсутствии других заболеваний были получены из медицинских карт пациентов.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Биохимические методы исследования

Метаболический статус оценивали по следующим показателям: гликемия натощак, общий холестерин, ЛПВП-холестерин и ЛПНП-холестерин, триглицериды, С-пептид, гликированный гемоглобин (HbA1c), 1,5-ангидро-D-глюцитол (1,5-anhydro-D-glucitol - 1,5-AG).

Концентрацию глюкозы измеряли из образцов венозной крови по методу глюкозооксидазы.

Показатели липидного обмена (общий холестерин, ЛПВП-холестерин, ЛПНП-холестерин) анализировали с использованием стандартных ферментативных методов – методом холестеролэстеразы.

Концентрацию триглицеридов определяли методом глицерофосфатоксидазы.

Концентрацию C-пептида, основного показателя функции β -клеток островков поджелудочной железы, измеряли иммуноэнзиматическим методом с использованием DIAsource Immuno Assay (C-peptide), произведенный R&D Systems, Inc. (США).

HbA1c анализировали иммунотурбидиметрическим методом (Cobas Integra 400/700/800), стандартизированным в соответствии с IFCC [274].

Концентрация 1,5-AG, маркера постпрандиальной гипергликемии [275], была определена с использованием модифицированного ферментного метода [276]. Хотя на сегодняшний день уровень 1,5-AG не является стандартным маркером для контроля диабета, однако, это единственный параметр, который ретроспективно определяет эпизоды краткосрочной постпрандиальной гипергликемии у пациентов с близкими или целевыми уровнями HbA1c. Поэтому снижение уровня 1,5-AG ретроспективно указывает на гипергликемические эпизоды (уровень 1,5-AG в норме 13,8 - 30,2 мг/л) [276, р. 132]. Методика: 100 μ l образцов плазмы, депротеинизированных трихлоруксусной кислотой, были пропущены через двухслойные микроколонки, заполненные ионообменной смолой (катионообменная смола Dowex 50WX8; анионообменная смола Dowex 1X8, Sigma) для извлечения глюкозы. 1,5-AG был извлечен в проточной фракции. Перекись водорода, образованная при ферментативном окислении 1,5-AG с пиранозооксидазой была обнаружена стандартным методом с использованием ферментативной системы цветного проявления.

Определение уровня интерлейкина-7, лимфопоэтического фактора роста, в сыворотке крови проводили иммуноэнзиматическим методом (ИФА) с помощью набора Quantikine® HS ELISA, Human IL-7 Immunoassay, произведенный R&D Systems, Inc. (США).

Тимичекый выброс у исследуемых групп определяли по двум показателям: по концентрации Т-рецепторных эксцизионных колец в мононуклеарных клетках периферической крови методом ПЦР в режиме реального времени и по содержанию эмигрантов тимуса в периферической крови методом проточной цитофлюориметрии.

2.2.2 Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Геномную ДНК экстрагировали из мононуклеарных клеток периферической крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMC) с использованием QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Germany).

Изоляция PBMC

Шесть миллилитров (мл) венозной крови собирали в пробирки с содержанием ЭДТА и использовали для изоляции PBMC путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Нураque [277]. До выделения

ДНК, РВМС промывали два раза в фосфатно-солевом буфере и хранили при -80°C как сухой гранул.

Выделение ДНК

Все ДНК из гранул РВМС были выделены с помощью геномного набора для очистки (Promega, Madison, WI, USA) в соответствии с инструкцией изготовителя [278]. Каждый образец до анализа элюировали в дегидрационный раствор ДНК и хранили при 40°C. Концентрацию ДНК определяли по показаниям оптической плотности с использованием Nano-100 Микро-спектрофотометра (Hangzhou Allsheng Instruments Ltd, Zhejiang, China).

Количественная оценка sjTREC

Количественный анализ ПЦР осуществлялся на LightCycler® 480 System (Roche, Mannheim, Germany), определялись сигнал-соединения (signal-joint - sj) TREC и Т-клеточный рецептор альфа константы (Т Cell Receptor Alpha Constant – TRAC) в соответствии с ранее известными методами [279, 280]. Геномную ДНК экстрагировали из РВМС. Усиление TRAC использовано в качестве внутреннего контроля и нормализации входа ДНК. ПЦР проводили в 10 мкл содержащих растворов ~ 50 нг ДНК, 1x LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Mannheim, Germany), 0,5 мкм каждого прямого и обратного праймеров и 0,2 мкм FAM-BHQ1 зонд (Institute of Biochemistry and Biophysics, Warsaw, Poland). Праймеры прямого sjTREC (5'- TGCCACATCCCTTTCAACC -3') и обратного (5'- TGAGAACGGTGAATGAAGAG-3'), зонд sjTREC (5'-Fam-ACCCCGTGCCTAAACCCTGC-BHQ-1-3') так же как праймеры прямого TRAC (5'- TAACCCTGATCCTCTTGTC-3') и обратного (5'-ATCGGTGAATAGGCAGACAG-3') и зонд TRAC (5'-Fam-TCACTGGATTTAGAGTCTCTCAGC-BHQ-1-3') проведены с использованием Oligo Primer Analysis Software version 5.0 (Cascade, CO, USA). Уникальность праймеров и зондов подтверждена поиском BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Количество копий sjTREC и TRAC получены путем экстраполяции соответствующих пробных партий из стандартных кривых, которые были получены путем серийного разведения линейаризованных плазмид, содержащих вставки ДНК sjTREC и TRAC. В этих целях фрагменты sjTREC и TRAC были клонированы в pGEM-T Easy vectors (Promega, Madison, WI, США) [281]. Вставки плазмид были идентифицированы с помощью ПЦР и подтверждены прямой последовательностью. Концентрация sjTREC на 10⁶ РВМС рассчитана по формуле (1):

$$\text{среднее количество sjTREC} / \text{среднее количество TRAC} / 2 \quad \times 10^6 \quad (1)$$

Так как в каждой клетке по две копии TRAC (по одной для каждой хромосомы), среднее значение TRAC разделили на 2.

2.2.3 Метод проточной цитофлюориметрии

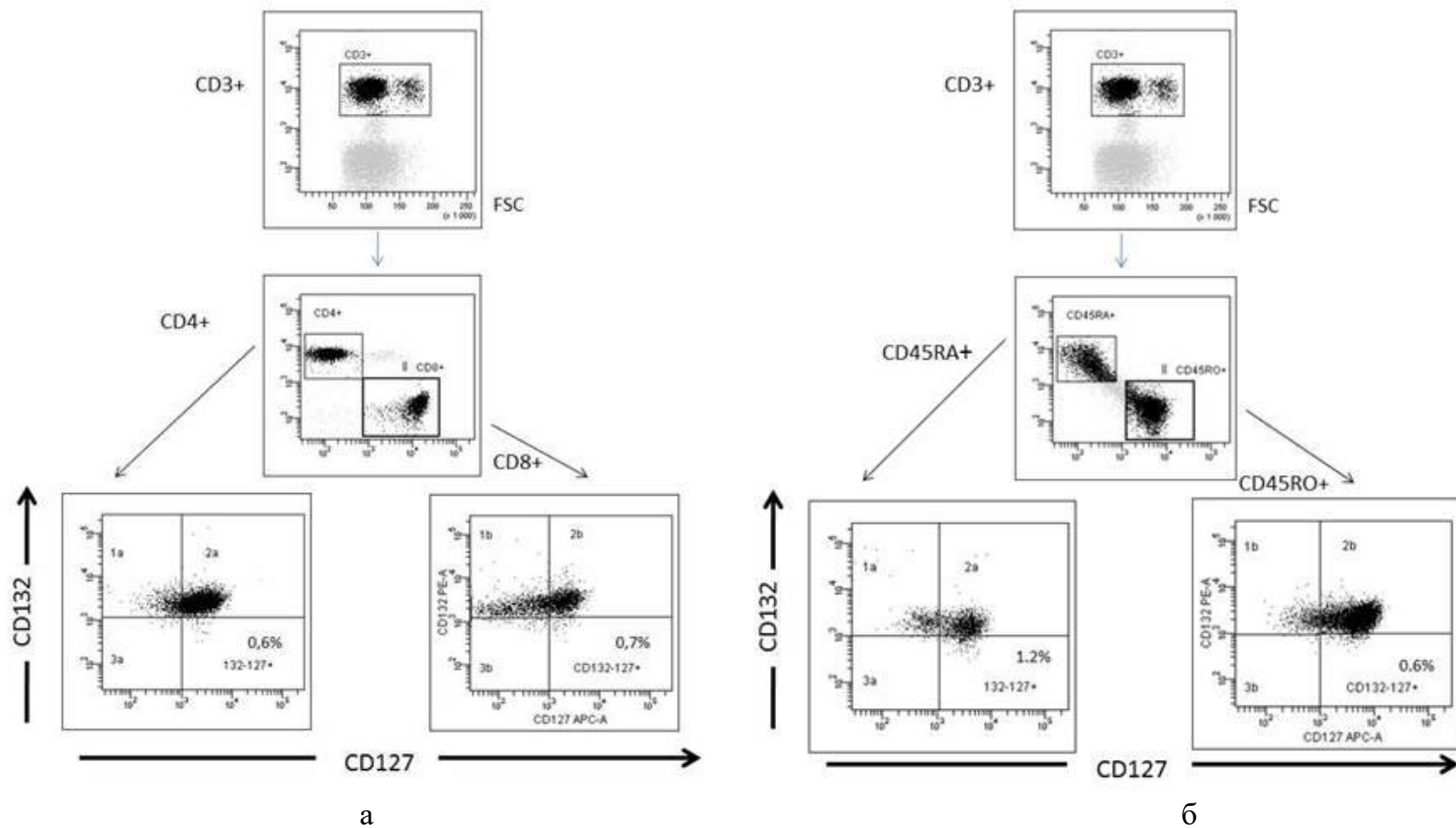
Для того, чтобы обнаружить подмножества лимфоцитов CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺, CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻, CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD132⁺ 127⁻, CD132⁺127⁺, CD132⁻127⁺ образцы 3-4 мл цельной периферической крови собрали в ЭДТА, поддерживали при 4°C и обрабатывали в течение 6 часов

после сбора. Поверхностные антигены лимфоцитов каждого исследуемого, характеризующие популяцию лимфоцитов, были обнаружены методом проточной цитометрии (FACS Canto Vecton Dickinson) с помощью прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител мышей против антигенов человека. В пробирки FACS, содержащие моноклональные антитела было добавлено 150 мкл периферической крови. Для лизиса красных кровяных клеток, добавляли 2 мл раствора FACSlyse (BD) затем пробирки инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Образцы декантировали после центрифугирования в течение 5 мин. Собранные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Diva (BD). Были получены минимум 30 000 событий для каждого образца. Фенотипы полученных субпопуляций выражались как процент от уровня всех лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD127 и/или CD132, и были определены как среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI - Mean fluorescence intensity).

Согласно Sasson S.C. (2012) экспрессия CD132 и CD127 позволяет дифференцировать эмигрантов тимуса следующим образом: CD132⁻CD127⁺ – недавние эмигранты тимуса (RTE); CD132⁺CD127⁺ – типичные эмигранты тимуса; CD132⁺CD127⁻ - окончательно дифференцированные эмигранты тимуса [243, p. 31148].

Стратегия синхронизации

После пропускания лимфоцитов на участках FSC/SCC для ориентации популяции CD3⁺ был создан комбинированный вход с FSC/CD3. Кроме того, популяция CD3⁺ была представлена на участках CD45RA против CD45RO или CD4 против CD8. Каждая отдельная популяция среди клеток CD3⁺, т.е. CD4⁺, CD8⁺, CD45⁺RA⁺ и CD45⁺RO⁺, были окончательно оценены для совместной экспрессии антигенов CD132 и CD127. В качестве контроля образцы CD3 и CD4, CD8 или CD45RO, CD45RA были помечены соответствующими контрольными изотипами для определения экспрессии CD132 и CD127 (рисунок 5).



а - $CD3^+RO^-RA^+$, $CD3^+RO^+RA^-$; б - $CD3^+CD4^+CD127^+132^-$, $CD3^+CD8^+CD127^+132^-$

Рисунок 5 – Фенотипы в группе больных, получавших метформин (исходные данные)

2.3 Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «STATISTICA 8.0» фирмы StatSoft, Inc. США. Соответствие выборок нормальному распределению проверяли с использованием теста Шапиро-Уилко. Статистические гипотезы были проверены тестом Крускала-Уоллиса или U-Манна-Уитни в случае ненормального распределения. В случае нормального распределения использован дисперсионный анализ ANOVA или тест-Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Данные в тексте представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение (mean \pm SD). Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число и относительная величина в %.

3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

Анализ особенностей клинического течения и результатов лабораторного исследования у 86 пациентов сахарным диабетом 2 типа, получавших разные виды антидиабетической терапии, и 14 лиц без сахарного диабета представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Клиническая характеристика исследуемых групп

Исследуемые показатели	Больные СД 2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
Возраст (лет)	66,8 ± 8,6	68,6 ± 9,0	67,5 ± 8,7	63,9 ± 11,6
ИМТ (кг/м ²)	32,2 ± 5,3	34,0 ± 4,9	33,7 ± 5,3	29,7 ± 3,6
Длительность СД2 (лет)	7,1 ± 3,1	8,1 ± 2,0	2,8 ± 1,7**	-
ГН (ммоль/л)	7,1 ± 1,4*	9,5 ± 3,8*;**	6,5 ± 1,2	5,1 ± 0,3
HbA _{1c} (%)	6,8 ± 0,7*	7,9 ± 1,2*;**	6,4 ± 0,6*	5,3 ± 0,3
1,5-AG (мг/л)	17,7 ± 5,1*	11,5 ± 4,6*;**	20,5 ± 4,0	23,1 ± 3,1
ОХ (mmol/l)	4,5 ± 1,0	4,3 ± 0,9	5,0 ± 1,3	4,7 ± 0,5
ЛПНП (ммоль/л)	2,3 ± 0,9	2,0 ± 0,8***	2,8 ± 1,1	2,4±0,3
ЛПВП (ммоль/л)	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,5±0,3
ТГ (ммоль/л)	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,7	1,9 ± 0,9	1,6±0,2
С-пептид (нг/мл)	2,2 ± 1,0	2,1 ± 1,0	2,7 ± 1,2	1,7 ± 0,6
*По отношению к контрольной группе, $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп); **По отношению к другим группам СД2, $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп); ***По отношению к группе без фармакологического лечения, $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)				

Пациенты во всех группах были одинаковыми по возрасту и индексу массы тела (ИМТ). Сывороточный уровень С-пептида, показатели липидного профиля, за исключением уровня ЛПНП, в сыворотке крови также были одинаковыми у всех категории лиц. Клинически явная продолжительность сахарного диабета была дольше у пациентов, принимавших метформин, и у пациентов, получавших инсулин в комбинации с метформином, чем у больных СД2 без фармакологического лечения. Показатели гликемии натощак и HbA_{1c} были достоверно выше, а уровень 1,5-АГ был статистически ниже в группе больных, получавших комбинацию инсулина с метформином, чем в двух других группах с СД2. Уровень ЛПНП в сыворотке крови был ниже у больных, получавших инсулин в комбинации с метформином, по сравнению с группой без фармакологического лечения.

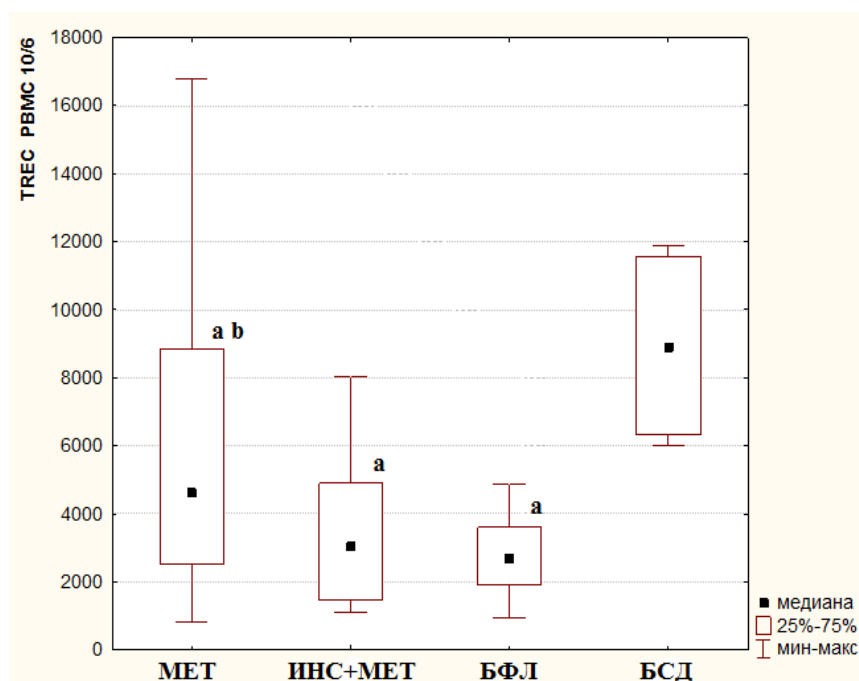
4 КОНЦЕНТРАЦИЯ Т-РЕЦЕПТОРНЫХ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ (TREC) В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Результаты статистического анализа концентрации TREC в периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Концентрация Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) в мононуклеарных клетках периферической крови у больных СД2

Исследуемый показатель	Больные СД 2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
TREC в РВМС 10^6	$4631,5 \pm 4140,0^{*;**}$	$3357,5 \pm 2029,0^*$	$2883,1 \pm 1166,0^*$	$8956,8 \pm 2266,7$
*По отношению к контрольной группе, $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп);				
**По отношению к другим группам СД2, $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)				

Результаты исследования по выбросу Т-клеток из тимуса показали, что концентрации TREC в РВМС у больных сахарным диабетом 2 типа во всех группах были достоверно ниже по отношению к группе лиц без диабета: у больных СД2, не получавших медикаментозное лечение, в 3,1 раза, у больных, получавших комбинацию инсулин с метформинном, в 2,7 раза, у больных, леченных метформинном в 2 раза.



a - по отношению к контролю $p \leq 0,05$; b - по отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$

Рисунок 6 – Концентрация TREC в РВМС у больных сахарным диабетом 2 типа

При сравнении результатов среди диабетических групп обнаружено, что концентрация TREC в РВМС была статистически значимо выше у больных, получавших метформин, по отношению к группе больных, получавших комбинацию инсулина с метформином, и группе больных СД2, не получавших медикаментозного лечения, в 1,4 раза и в 1,6 раза соответственно. В свою очередь, между последними двумя группами статистически значимых различий в уровнях TREC не было выявлено (рисунок 6).

5 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ CD132 и CD127 И ИХ ЭКСПРЕССИЯ НА НАИВНЫХ, CD4⁺, CD8⁺ Т-КЛЕТКАХ И Т-КЛЕТКАХ ПАМЯТИ

5.1 Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ (RTE) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа

5.1.1 Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ в субпопуляции наивных CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

Экспрессия антигенов CD132 и CD127 и содержание клеток CD127⁺CD132⁻ в субпопуляции наивных Т-клеток в периферической крови отражена в таблице 4.

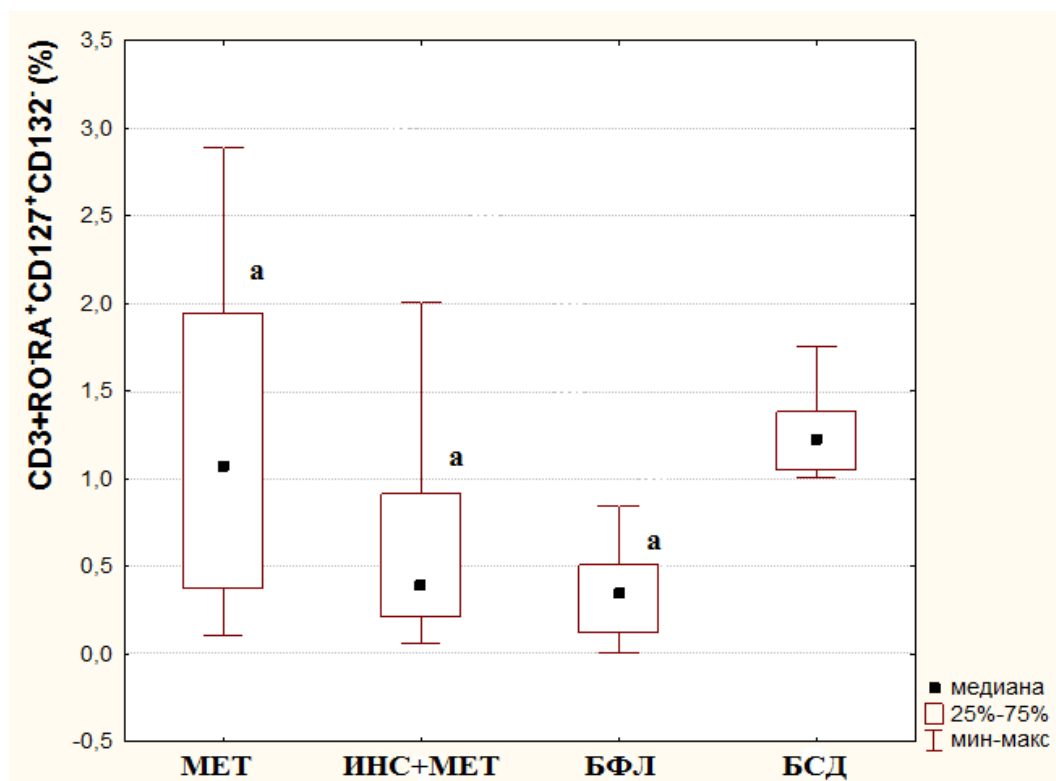
Таблица 4 – Экспрессия антигенов CD132 и CD127 и содержание клеток CD127⁺CD132⁻ (RTE) в наивных Т-клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД 2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ (%)	36,2 ± 11,8*	36,6 ± 11,9*	36,0 ± 13,4*	49,1 ± 5,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	2437,6 ± 567,5*	2272,5 ± 314,2*	2370,4 ± 399,8*	2949,7 ± 555,8
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	2889,4 ± 722,1*;**	2295,8 ± 642,6*	2032,0 ± 687,6*	3729,4 ± 601,4
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ (%)	1,2 ± 0,9**	0,7 ± 0,6*	0,3 ± 0,3*	1,3 ± 0,2
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	558,9 ± 50,1***	600,3 ± 51,6	589,0 ± 35,7	603,7 ± 45,9
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	3486,7 ± 840,6**	3031,7 ± 635,4	2831,3 ± 900,5	3094,1 ± 482,9
*По отношению к контрольной группе, p≤0,05 (при сравнении всех групп); **По отношению к другим группам СД2, p≤0,05 (при сравнении диабетических групп); ***По отношению к группе инсулин+метформин, p≤0,05 (при сравнении диабетических групп)				

Процент наивных CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ Т-клеток в периферической крови больных сахарным диабетом 2 типа по сравнению с группой здоровых лиц был достоверно ниже у больных, получавших метформин, и группе пациентов без фармакологического лечения в 1,4 раза, а в группе больных, получавших инсулин с метформином в 1,3 раза. Анализ средней интенсивности флуоресценции (MFI) антигенов рецепторов для IL-7 – CD132 и CD127 на наивных Т-клетках показал, что экспрессии обоих рецепторов были значимо ниже во всех диабетических группах по сравнению с недиабетической группой. Однако сравнение этих показателей между диабетическими группами выявило, что экспрессия CD127 на CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ клетках в группе, получавших

метформин, была статистически выше, чем в двух других диабетических группах.

Процент $CD45^+CD3^+RO^-RA^+CD127^+CD132^-$ клеток также достоверно был ниже во всех диабетических группах по отношению к контрольной, за исключением больных, получавших метформин, где количество клеток достоверно не отличалось от контрольной группы. При сравнении всех диабетических групп выявлено, что в группе, получавшей метформин, экспрессия $CD45^+CD3^+RO^-RA^+CD127^+CD132^-$ была статистически значимо выше (рисунок 7).



а - по отношению ко всем группам $p \leq 0,05$

Рисунок 7 – Содержание RTE в популяции $CD45^+CD3^+RO^-RA^+$ у больных СД2

Кроме того, значение MFI для CD127 в группе, получавшей метформин, было также достоверно выше по отношению к другим диабетическим группам (таблица 5).

5.1.2 Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание $CD127^+CD132^-$ в субпопуляции $CD45^+CD3^+CD4^+$ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

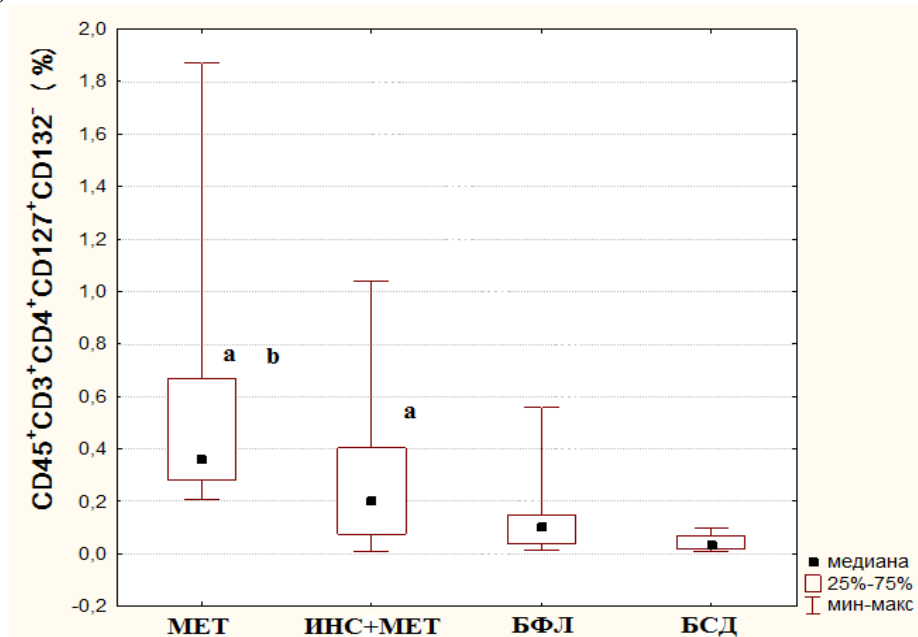
Экспрессия антигенов CD132 и CD127 и содержание $CD127^+CD132^-$ (RTE) в $CD4^+$ клетках в периферической крови представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Экспрессия антигенов CD132 и CD127 и содержание клеток CD127⁺CD132⁻ (RTE) в CD4⁺ клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД 2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	40,3 ±10,3***	35,4 ±10,2*	33,1 ± 10,1*	45,2 ±5,2
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	3085,4 ± 386,7*	2947,9 ± 400,8*	3029,7 ± 417,6*	3427,4 ± 214,1
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	4489,3 ± 1206,0***	4244,8 ± 1124,0	3684,1 ± 1467,5*	5070,9 ± 645,4
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ (%)	0,6 ± 0,5*;**	0,3 ± 0,2*	0,1 ± 0,2	0,04 ±0,03
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	1086,2 ± 50,6	1072,3 ± 51,2	1062,9 ± 81,0	1039,3 ± 53,4
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	2794,0 ± 965,8*;**	2490,3 ± 656,9	1858,3 ± 451,8	1952,9 ± 156,2

*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп);
 **По отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп);
 ***По отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)

Процент клеток CD4⁺ был достоверно ниже в группе больных, получавших комбинацию инсулин+метформин, и в группе больных СД2 без фармакологического лечения, чем в контрольной группе. В тоже время монотерапия метформином не привела к статистической разнице в содержании CD4⁺ Т-клеток периферической крови при сравнении с лицами без диабета (рисунок 8).



a - по отношению к коонтрольной группе $p \leq 0,05$; b - по отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$

Рисунок 8 – Содержание RTE в CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Т-клетках у больных СД2

Экспрессия CD127 на этих же клетках согласно данным MFI в группе, получавших метформин, и группе, леченных инсулином с метформином, была схожей с контрольной группой, но статистически меньше, чем у больных СД2 без фармакологического лечения. При сравнении диабетических групп процент CD4⁺ и экспрессия CD127 в группе больных, получавших метформин, были достоверно выше по отношению к группе без фармакологического лечения.

При анализе содержания клеток CD132⁻CD127⁺ и MFI для антигена CD127 выявлено, что оба показателя были достоверно выше в группе больных, получавших метформин, как при сравнении с контрольной группой (для CD132⁻CD127⁺ 15 раз и для MFI CD127 1,5 раза), так и среди диабетических групп (по сравнению с больными, получавших комбинацию инсулина с метформином, CD132⁻CD127⁺ в 2 раза и для MFI для CD127 в 1,1 раза; с группой без фармакологического лечения CD132⁻CD127⁺ в 6 раз и для MFI для CD127 в 1,5 раза). Кроме того, достоверно более высокое содержание (в 7,5 раза) CD132⁻CD127⁺ зарегистрировано в группе больных, получавших инсулин в комбинации с метформином, по отношению к недиабетической группе.

5.1.3 Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ (RTE) в субпопуляции CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ в CD8⁺ клетках у больных СД2 представлены в таблице 6.

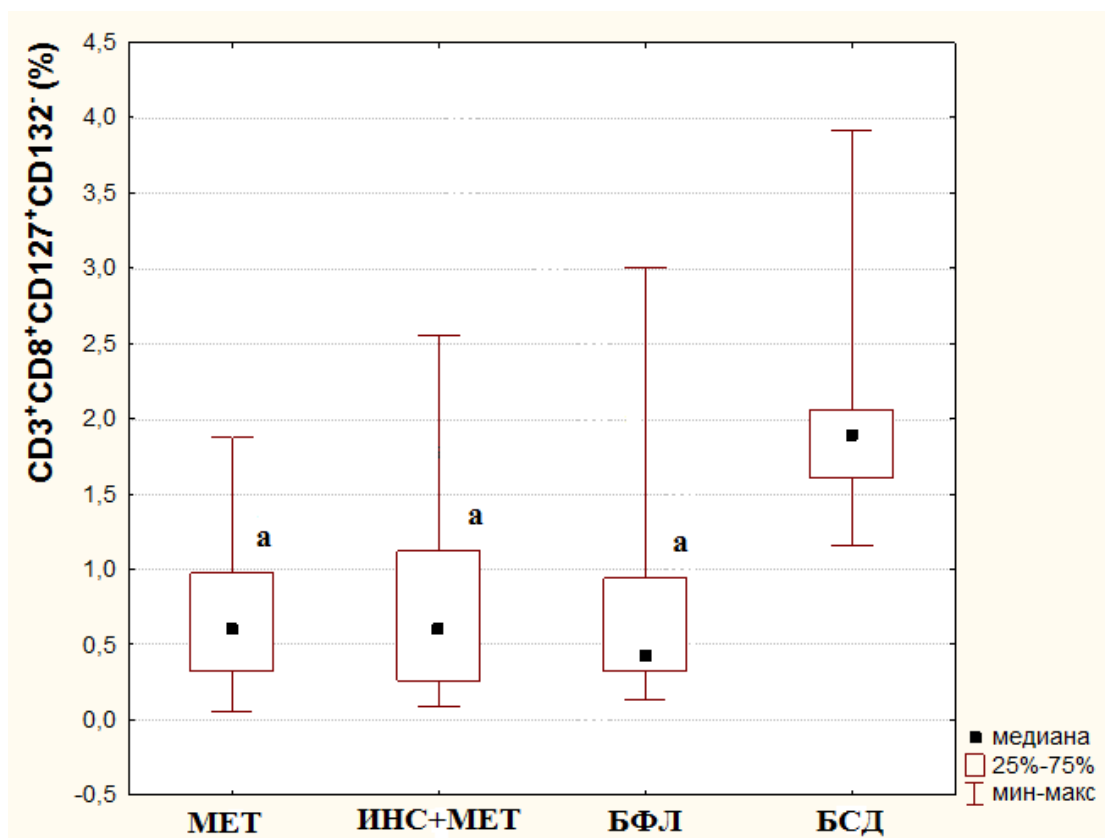
Таблица 6 – Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание клеток CD127⁺CD132⁻ (RTE) в CD8⁺ клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	31,6 ± 11,3**	40,5 ± 12,5	41,1 ± 13,5	29,9 ± 6,9
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	3999,2 ± 1898,4	3420,0 ± 849,8	3167,5 ± 411,6*	3719,2 ± 297,6
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	2264,6 ± 853,4	1989,5 ± 509,8 ^a	1563,8 ± 550,4*	2852,2 ± 678,0
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ (%)	0,7 ± 0,4*	0,8 ± 0,7*	0,7 ± 0,7*	2,1 ± 0,8
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD132 expression (MFI)</i>	908,4 ± 58,6	914,3 ± 57,4	891,1 ± 53,1	918,6 ± 43,5
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁻ CD127 ⁺ <i>CD127 expression (MFI)</i>	3142,8 ± 830,3	3219,3 ± 896,6	2271,0 ± 464,3**	2924,9 ± 541,9
*По отношению к контрольной группе p≤0,05 (при сравнении всех групп); **По отношению к другим группам СД2 p≤0,05 (при сравнении диабетических групп)				

Анализ процентного содержания $CD45^+CD3^+CD8^+$ клеток не выявил статистически значимых различий среди всех исследованных групп. В тоже время сравнение между диабетическими группами показало, что процент $CD8^+$ клеток был ниже у больных СД2, получавших метформин, по сравнению с группой больных, леченных комбинацией инсулина с метформином, на 22% и с группой, не получавших антидиабетические препараты, на 23,1%.

При анализе интенсивности экспрессии $CD127$ на $CD8^+$ клетках по отношению к контрольной группе лиц без диабета установлены достоверно низкие показатели MFI в группе больных, получавшей инсулин в комбинации метоформином, и в группе, не получавшей фармакологического лечения, а также отсутствие статистической разницы в группе больных, получавшей метформин.

Процент $CD45^+CD3^+CD8^+CD132^-CD127^+$ клеток было ниже во всех группах с диабетом, чем в контрольной группе, хотя значение MFI для $CD127$ в популяции этих клеток были похожими между всеми обследованными группами, за исключением группы БФЛ. Анализ последнего показателя среди диабетических групп не выявил статистической разницы в группах больных, получавших антидиабетическую фармакотерапию (рисунок 9).



а - по отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$

Рисунок 9 – Содержание $CD132^-CD127^+$ в $CD45^+CD3^+CD8^+$ клетках у больных СД2

5.1.4 Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ (RTE) в субпопуляции Т-клеток памяти CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа

Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ (RTE) в Т-клетках памяти CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ у больных СД2 представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Анализ экспрессии антигенов CD132 и CD127 и содержание CD127⁺CD132⁻ (RTE) в Т-клетках памяти CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ (%)	48,0 ±13,4	44,8 ±12,9	46,1 ± 15,1	43,6 ± 4,2
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 expression (MFI)	3001,5 ± 1297,1*	2207,3 ± 317,5	2179,1 ± 298,5	4877,6 ± 580,8
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD127 expression (MFI)	4611,6 ± 1322,4	4598,8 ± 959,6	4183,4 ± 1146,8	4992,5 ± 795,0
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁻ CD127 ⁺ (%)	0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,5	1,0 ± 0,8
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁻ CD127 ⁺ CD132 expression (MFI)	531,0 ± 164,2	606,9 ± 37,1	618,5 ± 35,4	620,2 ± 52,4
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁻ CD127 ⁺ CD127 expression (MFI)	3684,7 ± 1133,2	3539,7 ± 1127,9	3394,6 ± 1081,7	3100,5 ± 806,7
*По отношению к другим группам СД2 p≤0,05				

Статистический анализ не выявил никаких различий в процентном содержании CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ клеток памяти среди всех исследованных групп, а также среди групп с диабетом. Значение MFI CD132 было статистически выше в группе больных, получавших метформин, по сравнению с другими группами больных СД2. Никаких существенных различий не наблюдалось в популяции Т-клеток памяти, характеризующихся CD127⁺CD132⁻, среди всех исследованных групп.

5.2 Содержание CD127⁺CD132⁺ Т-клеток (типичные эмигранты) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа

5.2.1 Содержание CD127⁺CD132⁺ в субпопуляции наивных CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

Содержание CD127⁺CD132⁺ в наивных Т-клетках у больных СД2 представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание CD127⁺CD132⁺ в наивных Т-клетках у больных СД2

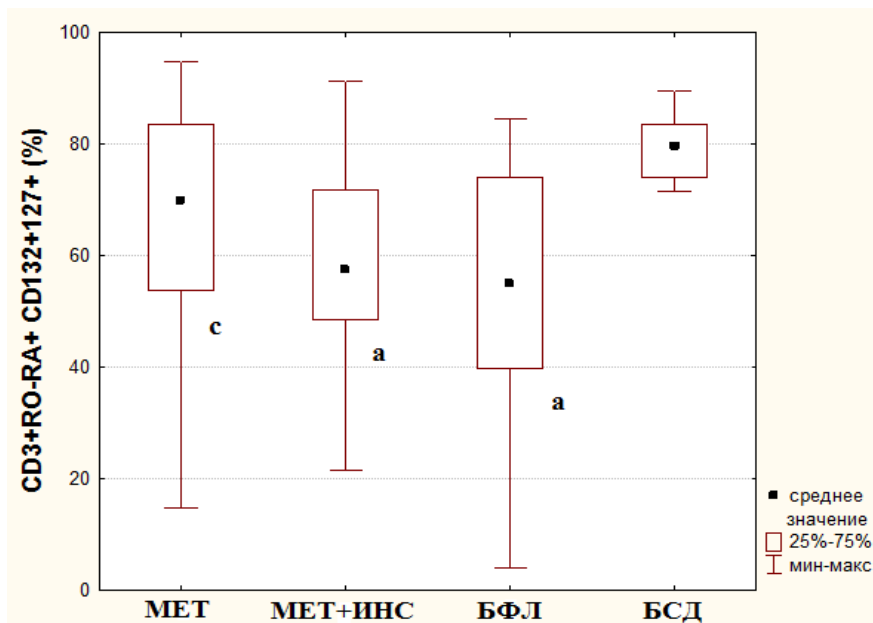
Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
1	2	3	4	5
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RORA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ (%)	66,8 ± 20,6**	57,6 ±17,0*	53,4 ±20,9*	79,8 ±5,9

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RORA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD132 expression (MFI)	2170,5 ± 502,1*	2040,7 ± 255,8*	2122,0 ± 269,5*	2660,7 ± 186,8
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RORA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD127 expression (MFI)	3665,1 ± 820,8	3466,1 ± 578,1	3304,2 ± 771,6	3560,0 ± 345,0
*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп); **По отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)				

Процент CD127⁺CD132⁺ в наивных CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ клетках был ниже в группах с диабетом по сравнению с контрольной группой, за исключением группы больных, получавших метформин. Так, содержание CD127⁺CD132⁺ в группе, получавших комбинацию инсулина с метформином был в 1,4 раза и в группе без фармакологического лечения в 1,5 раз ниже, чем в контрольной группе. Кроме того выявлена статистическая разница процентного содержания CD127⁺CD132⁺ у больных, получавших монотерапию метформином, по сравнению с группой больных без медикаментозного лечения (рисунок 10).

Значения MFI для CD132 во всех диабетических группах были достоверно ниже в пределах 1,2–1,3 раза по отношению к здоровым лицам. В тоже время показатели MFI для CD127 были одинаковыми среди всех исследуемых групп. Статистическая разница в значениях показателя MFI для CD132 и CD127 среди диабетических групп не выявлено.



а - по отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$; с - по отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$

Рисунок 10 – Содержание CD127⁺CD132⁺ в CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ Т-клетках у больных СД2

5.2.2 Содержание CD127⁺CD132⁺ в субпопуляции CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

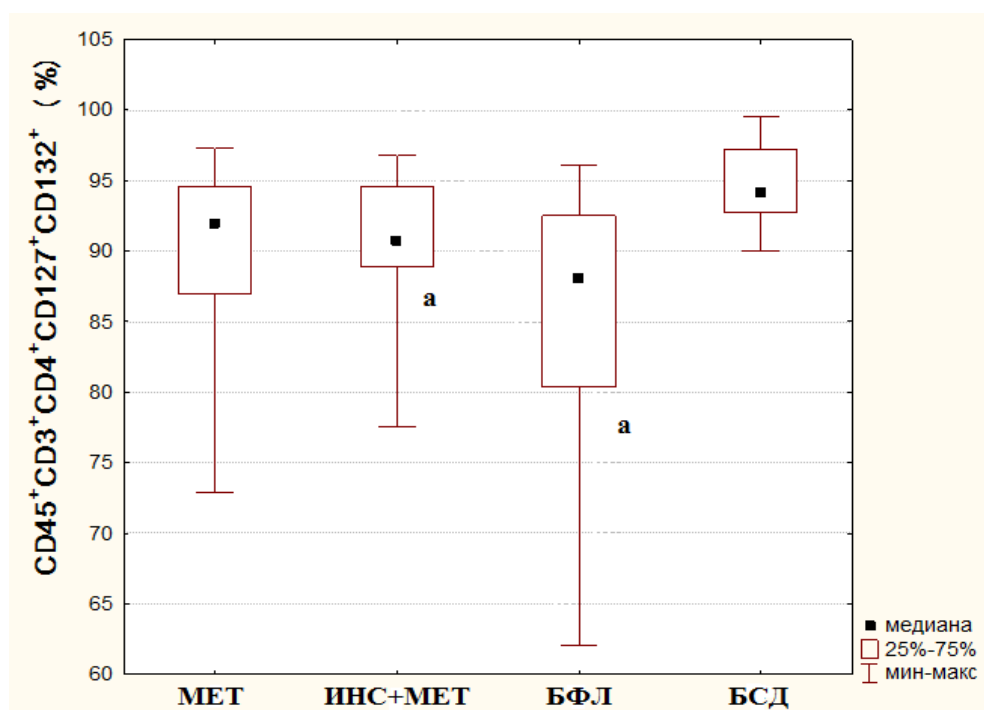
Содержание CD127⁺CD132⁺ в CD4⁺ клетках у больных СД2 представлено в таблице 9.

Таблица 9 – Анализ содержания CD127⁺CD132⁺ в CD4⁺ Т-клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ (%)	90,6 ± 5,6	90,3 ± 4,8*	84,7 ± 10,5*	94,7 ± 2,6
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD132 expression (MFI)	3092,7 ± 381,2	2972,8 ± 366,1*	3093,8 ± 366,3	3292,9 ± 324,6
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD127 expression (MFI)	4829,3 ± 1202,7	4786,1 ± 861,7	4279,7 ± 1419,6	5342,0 ± 711,2

*По отношению к контрольной группе p≤0,05

Процент CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD132⁺CD127⁺ клеток был ниже в диабетических группах за исключением группы, получавшей метформин. Показатель MFI для CD132 был достоверно ниже у больных СД2, получавших инсулин в комбинации с метформином, чем в контрольной группе. При анализе между диабетическими группами как по процентному содержанию CD45⁺CD3⁺CD4⁺, так и по уровню MFI для CD132, не было статистических различий в этой популяции (рисунок 11).



a - по отношению к контрольной группе p≤0,05

Рисунок 11 – Содержание CD132⁺CD127⁺ в CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клетках у больных СД2

5.2.3 Содержание CD127⁺CD132⁺ в субпопуляции CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

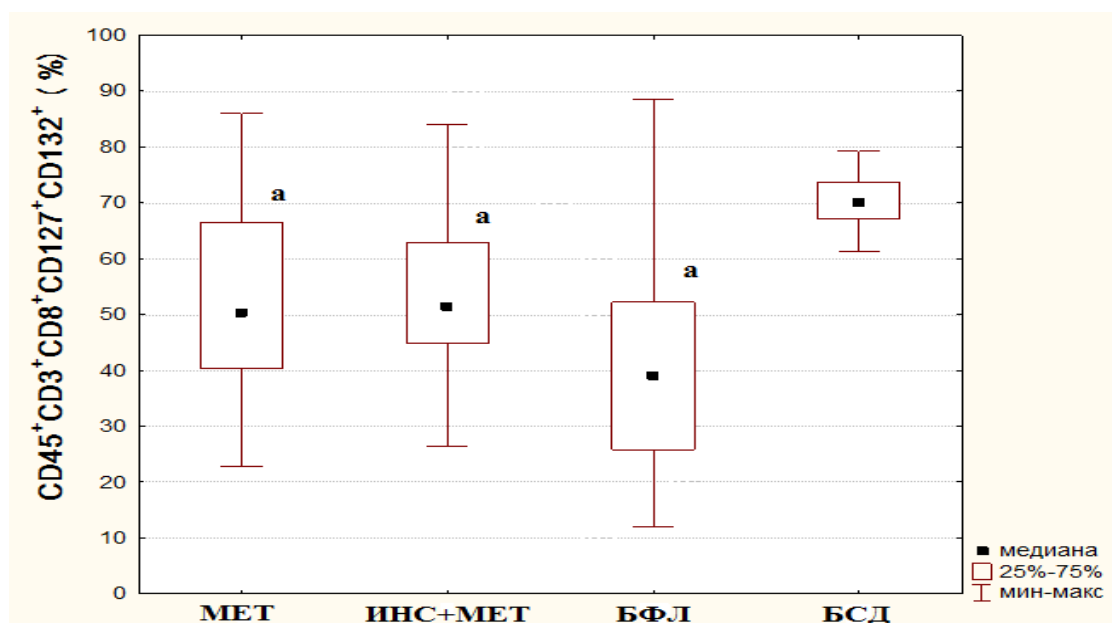
Содержание CD127⁺CD132⁺ в CD8⁺ клетках в периферической крови отражено в таблице 10.

Таблица 10 – Содержание CD127⁺CD132⁺ в CD8⁺ клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ (%)	52,2 ± 16,9*	52,5 ± 14,8*	40,9 ± 18,7*	70,5 ± 6,0
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD132 expression (MFI)	4424,3 ± 2086,5	3449,3 ± 724,7	3508,1 ± 655,3	3754,2 ± 575,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD127 expression (MFI)	3672,6 ± 859,4	3528,4 ± 718,1	3197,7 ± 889,6	3789,4 ± 663,5

*По отношению к контрольной группе p≤0,05

Процентные содержания CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD127⁺CD132⁺ были достоверно ниже в пределах 1,3-1,7 раз во всех диабетических группах по сравнению с контрольной группой. При сравнении этого показателя среди диабетических групп статистических различий не обнаружено (рисунок 12).



a - по отношению к контрольной группе p≤0,05

Рисунок 12 – Содержание CD132⁺CD127⁺ в CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клетках у больных СД2

Статистический анализ значения MFI для CD132 и CD127 не выявил достоверной разницы между всеми исследованными группами.

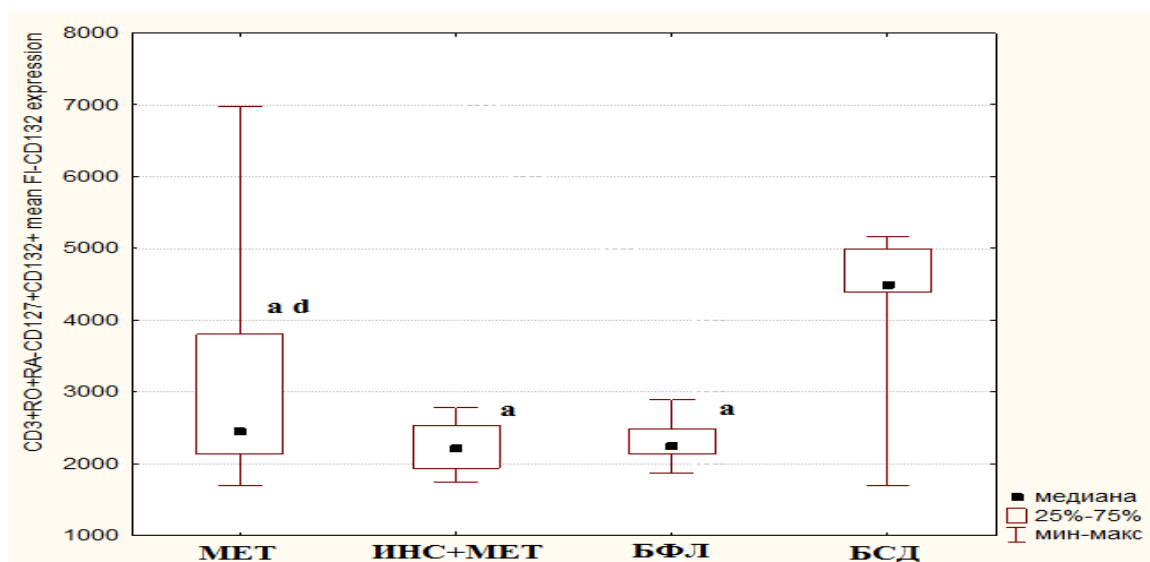
5.2.4 Содержание CD127⁺CD132⁺ в субпопуляции Т-клеток памяти CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа

Содержание CD127⁺CD132⁺ в Т-клетках памяти у больных СД2 представлено в таблице 11.

Таблица 11 – Содержание CD127⁺CD132⁺ в Т-клетках памяти у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁺ CD127 ⁺ (%)	83,6 ± 11,7	84,3 ± 8,6	82,8 ± 5,4	81,2 ± 10,6
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD132 expression (MFI)	3038,3 ± 1288,8*;**	2220,2 ± 309,7*	2329,3 ± 310,2*	4398,8 ± 873,9
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁺ CD127 ⁺ CD127 expression (MFI)	5233,0 ± 1282,6	5246,8 ± 884,1	4852,7 ± 1196,1*	6060,2 ± 800,2
*По отношению к контрольной группе p≤0,05;				
**По отношению к группе инсулин + метформин p≤0,05				

Результаты показали, что не было никаких различий в процентах CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻CD127⁺CD132⁺ клеток в периферической крови среди лиц всех исследуемых групп. Значения MFI для CD132 были достоверно ниже в группе больных, получавших инсулин в комбинации с метформином, в 2 раза и в группе больных, без фармакологического лечения, в 1,9 раз, по отношению к лицам без диабета, а в группе больных, получавших монотерапию метформином, достоверно выше в 1,2 раза по отношению к контрольной группе и в пределах 2,3-2,4 раза по отношению к другим диабетическим группам (рисунок 13).



a - по отношению к контрольной группе p≤0,05; d - по отношению к группе инсулин+метформин p≤0,05

Рисунок 13 – Значения MFI для CD132 в Т-клетках памяти у больных СД2

Разницы в экспрессии CD127 (MFI) при сравнении контрольной группой с диабетическими не выявлено, за исключением, группы больных, не получавших фармакологическое лечение.

5.3 Исследование содержания CD127-CD132⁺ Т-клеток (окончательно дифференцированные эмигранты) в субпопуляциях Т-лимфоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа

5.3.1 Исследование содержания CD127-CD132⁺ в субпопуляции наивных CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

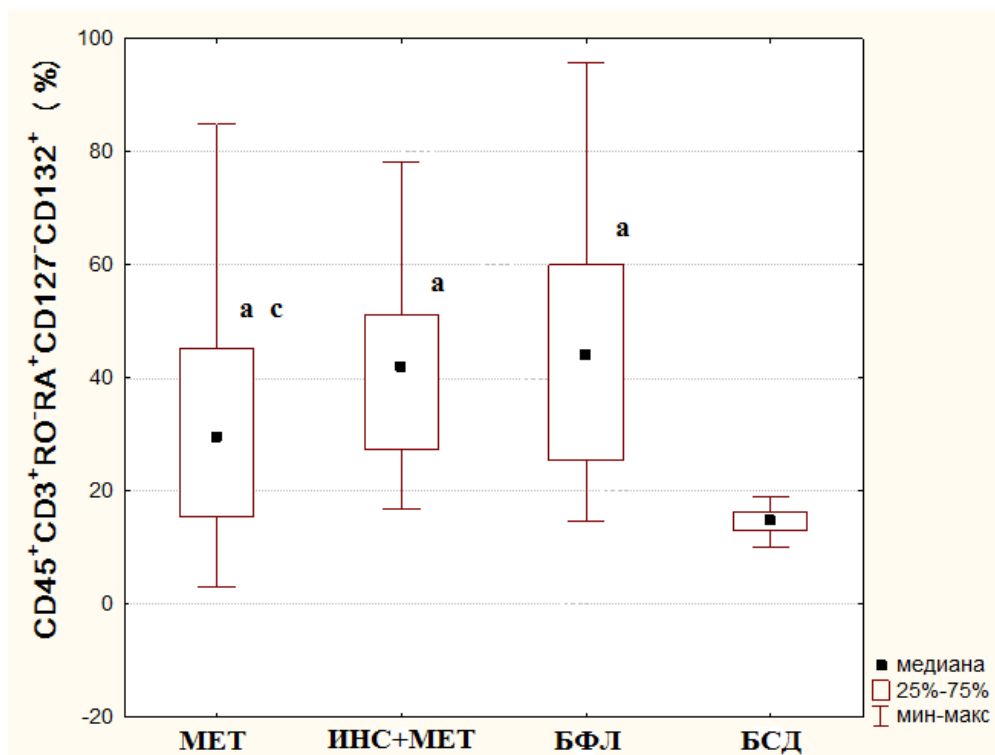
Содержание CD127-CD132⁺ среди наивных CD45⁺CD3⁺RO⁻RA⁺ Т-клеток у больных СД2 представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Содержание CD127-CD132⁺ среди наивных Т-клеток у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ (%)	32,4 ± 20,8*;**	42,0 ± 16,6*	46,1 ± 20,8*	14,5 ± 2,7
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ CD132 expression (MFI)	3266,2 ± 834,8*;***	2794,3 ± 583,2*	2783,3 ± 685,3*	5189,6 ± 617,5
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁻ RA ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ CD127 expression (MFI)	668,6 ± 83,7	673,0 ± 84,5	631,7 ± 96,6	708,7 ± 45,7
*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп); **По отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп); ***По отношению к группе инсулин+метформин $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)				

Количество окончательно дифференцированных клеток CD127-CD132⁺ в популяции наивных клеток во всех группах больных диабетом было достоверно выше по отношению к контрольной группе в пределах 2,3-3,2. При анализе данного показателя среди диабетических групп выявлено достоверное снижение содержания окончательно дифференцированных эмигрантов в группе, получавших метформин, по сравнению с больными СД2 без фармакологического лечения (рисунок 14).

Значения MFI для CD132 были достоверно ниже во всех диабетических группах по отношению к группе без диабета. Также была выявлено достоверное статистически значимое повышение экспрессии CD132 у больных СД2, леченных метформином, по отношению к группе, получавших комбинацию инсулин с метформином.



а - по отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$; с - по отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$

Рисунок 14 – Содержание $CD132^+CD127^-$ среди наивных Т-клеток у больных СД2

5.3.2 Исследование содержания $CD127^-CD132^+$ в субпопуляции $CD45^+CD3^+CD4^+$ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

Содержание $CD127^-CD132^+$ в $CD4^+$ клетках в периферической крови представлено в таблице 13.

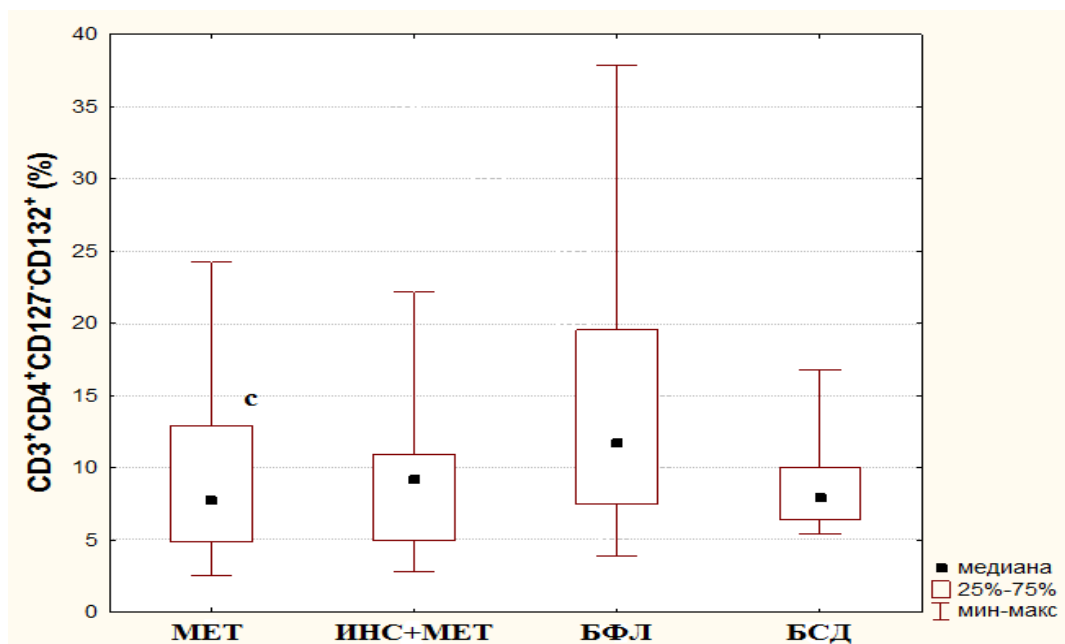
Таблица 13 – Содержание $CD127^-CD132^+$ в $CD4^+$ клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
$CD45^+CD3^+CD4^+CD132^+CD127^-$ (%)	$9,1 \pm 5,4^{**}$	$9,4 \pm 4,9$	$15,0 \pm 10,3$	$9,0 \pm 3,5$
$CD45^+CD3^+CD4^+CD132^+CD127^-$ CD132 expression (MFI)	$3152,5 \pm 577,1^*$	$3126,5 \pm 584,8^*$	$2942,7 \pm 487,3^*$	$3394,9 \pm 203,4$
$CD45^+CD3^+CD4^+CD132^+CD127^-$ CD127 expression (MFI)	$746,6 \pm 44,7^*$	$741,0 \pm 36,7^*$	$717,9 \pm 54,1^*$	$793,1 \pm 52,3$

*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп);
 **По отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)

Содержание $CD45^+CD3^+CD4^+CD132^+CD127^-$ клеток была статистически одинаково среди всех исследованных групп. Сравнение между диабетическими группами выявило статистически более высокий процент этих клеток в группе

без фармакологического лечения (в 1,7 раза), чем в группе, получавших метформин. В тоже время экспрессия CD132⁺и CD127⁻(MFI) была достоверное ниже во всех диабетических группах по сравнению с контролем (рисунок 15).



c - по отношению к группе без фармакологического лечения $p \leq 0,05$

Рисунок 15 – Содержание CD132⁺CD127⁻ в CD4⁺ Т-клетках у больных СД2

5.3.3 Исследование содержания CD127⁻CD132⁺ в субпопуляции CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клеток у больных сахарным диабетом 2 типа

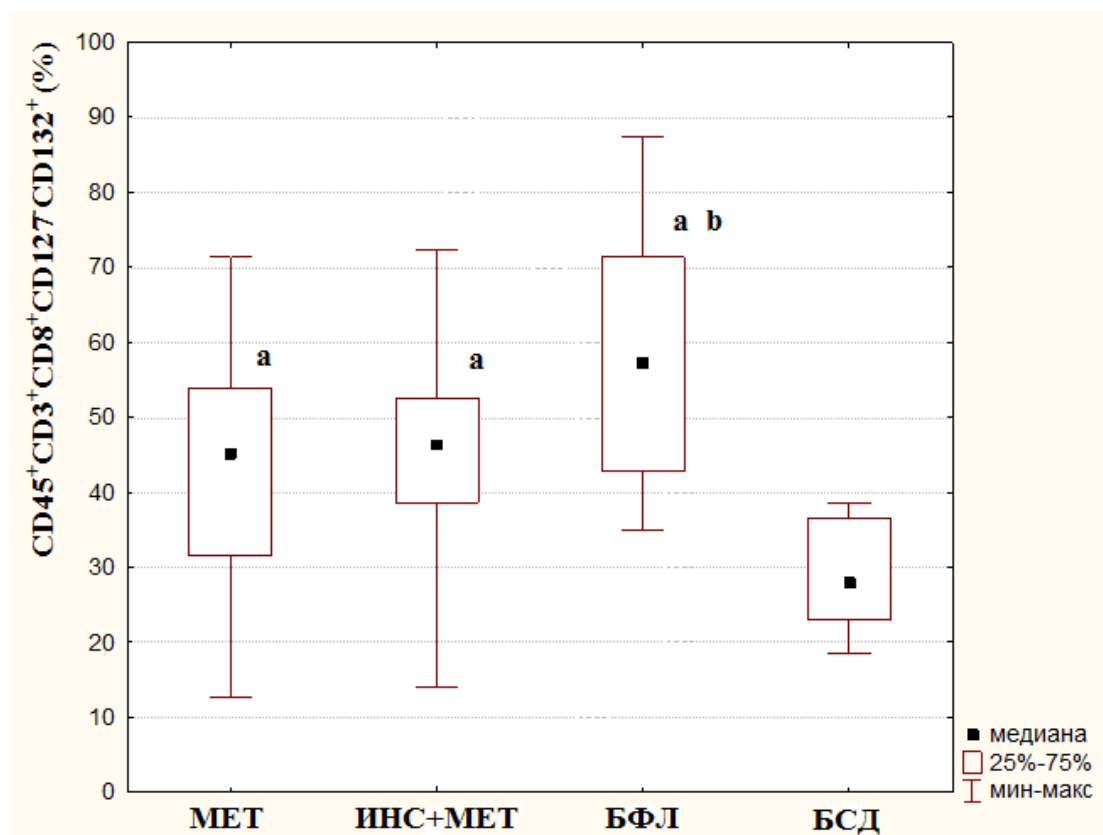
Анализ содержания CD127⁻CD132⁺ в CD8⁺ клетках в периферической крови у больных СД2 представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Содержание CD127⁻CD132⁺ в CD8⁺ клетках у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ (%)	43,6 ± 14,5*	45,8 ± 14,7*	58,2 ± 15,9*; **	28,5 ± 7,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ CD132 expression (MFI)	3208,2 ± 1096,5	3251,8 ± 593,1	3129,4 ± 367,2	3692,3 ± 447,6
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD132 ⁺ CD127 ⁻ CD127 expression (MFI)	551,1 ± 81,2***	613,6 ± 75,7*	546,1 ± 86,1	504,2 ± 52,7

*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп);
 **По отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп);
 ***По отношению к группе инсулин+метформин $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)

Частота окончательно дифференцированных клеток в популяции CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD132⁺CD127⁻ клеток была выше во всех группах больных с диабетом по сравнению с контрольной группой: в группе без фармакологического лечения в 2 раза; в группе больных, получавших комбинацию инсулина с метформином, в 1,6 раз; в группе, получавших монотерапию метформином, в 1,5 раза. При этом наиболее высокий процент повышения этих клеток отмечается в группе больных, не получавших фармакологического лечения, при сравнении с группами, получавшими антидиабетическое лечение (рисунок 16).



a - по отношению к контрольной группе $p \leq 0,05\%$; b - по отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$

Рисунок 16 – Содержание CD132⁺CD127⁻ в CD8⁺ Т-клетках у больных СД2

5.3.4 Исследование содержания CD127⁻CD132⁺ в субпопуляции Т-клеток памяти CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻ у больных сахарным диабетом 2 типа

Анализ содержания CD127⁻CD132⁺ в Т-клетках памяти в периферической крови у больных СД2 представлен в таблице 15.

Процентное содержание CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁻CD127⁻CD132⁺ клеток и значение MFI для CD132 достоверно ниже у больных, получавших комбинацию инсулина с метформином, и больных без фармакологического лечения по сравнению с контрольной группой. Значение этих же показателей в группе с метформином достоверно не отличалось от уровня контрольной группы.

Таблица 15 – Содержание CD127⁺CD132⁺ в Т-клетках памяти у больных СД2

Исследуемые показатели	Больные СД2			БСД
	МЕТ	ИНС+МЕТ	БФЛ	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RA ⁻ CD132 ⁺ CD127 ⁻ (%)	16,6 ± 6,4**	12,5 ± 4,2*	11,0 ± 3,6*	14,5 ± 2,7
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RACD132 ⁺ CD127 ⁻ CD132 expression (MFI)	2933,1 ± 1323,4	2236,4 ± 335,1*	2209,6 ± 326,7*	4393,8 ± 1910,7
CD45 ⁺ CD3 ⁺ RO ⁺ RACD132 ⁺ CD127 ⁻ CD127 expression (MFI)	672,8 ± 43,3	663,1 ± 47,9	648,4 ± 59,8	645,9 ± 72,3
*По отношению к контрольной группе $p \leq 0,05$ (при сравнении всех групп); **По отношению к другим группам СД2 $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп); ***По отношению к группе инсулин+метформин $p \leq 0,05$ (при сравнении диабетических групп)				

В то же время при сравнении всех диабетических групп у больных, получавши выше, чем в группе без фармакологического лечения в 1,5 раза и в группе, получавших комбинацию инсулина с метформином в 1,3 раза.

6 АНАЛИЗ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Результаты показали, что сывороточный уровень ИЛ-7 был статистически одинаковым во всех четырех исследуемых группах (рисунок 17).

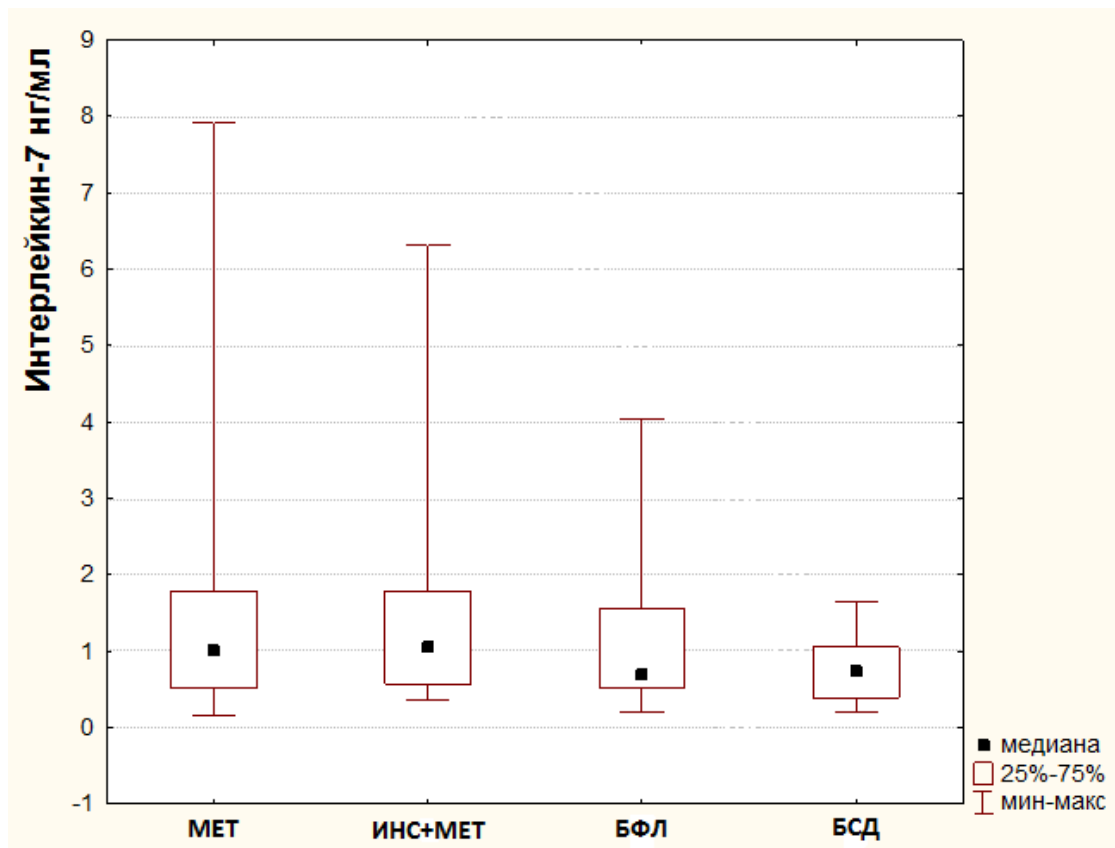


Рисунок 17 – Концентрация интерлейкина-7 в сыворотке у больных сахарным диабетом 2 типа

В целом, полученные результаты по изучению содержания эмигрантов тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа отражены на рисунке 18.

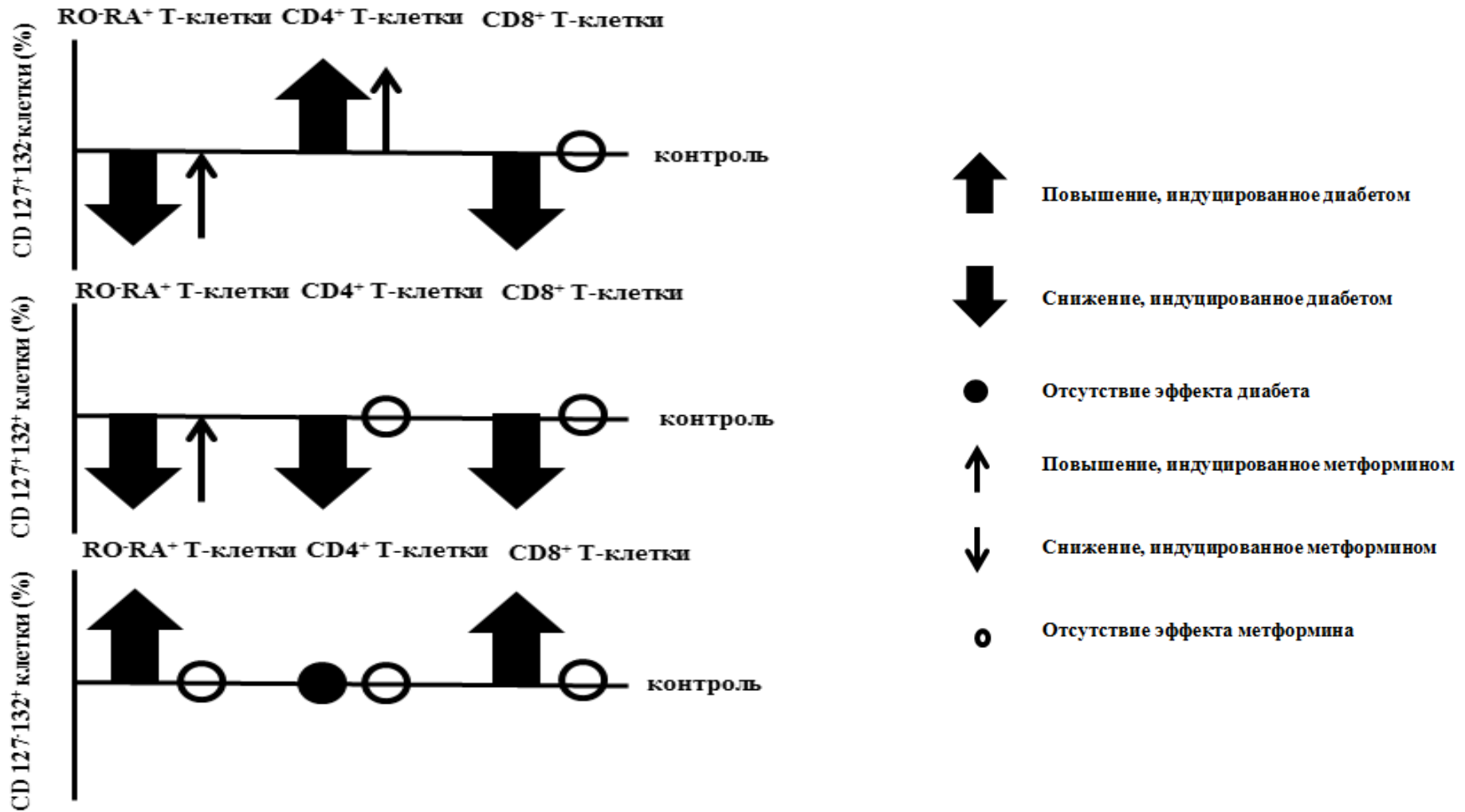


Рисунок 18 – Общая схема диабет- и метформин-зависимой эмиграции Т-клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Связь между сахарным диабетом и злокачественными новообразованиями, двумя хроническими, многофакторными, неоднородными заболеваниями, поставленных в ранг социально значимых заболеваний во всем мире, очевидна. Многочисленные эпидемиологические исследования убедительно доказали, что сахарный диабет является фактором повышенного риска развития некоторых видов злокачественных опухолей, их ускоренного прогрессирования и увеличения смертности [6, р. 9; 48, р. 40; 69, р. 1625]. Учитывая быстрые темпы распространенности сахарного диабета, особенно сахарного диабета 2 типа, сравнимые с эпидемией, увеличение онкологической заболеваемости принимает широкие масштабы на уровне популяций.

Установлено, что повышенный риск развития неоплазм у больных СД2, в первую очередь, связан с хронически повышенным плазменным уровнем инсулина, который является ростовым фактором, и гипергликемией [282]. Современные данные дают основание считать, что повышенный риск канцерогенеза у больных диабетом также связан с нарушением деятельности иммунной системы [11, р. 197], а именно, ключевого органа иммунного надзора - тимуса, имеющий решающее значение в создании и поддержании разнообразия антигенраспознающего Т-клеточного рецептора и обеспечивающего выброс на периферию пула Т-клеток, называемых недавними эмигрантами тимуса, играющих важную роль в иммунном ответе на чужеродные антигены [12, р. 1219; 13, р. 505].

На сегодняшний день нет согласованного мнения о том, как сахарный диабет влияет на структуру и функцию тимуса. Исследования, проведенные на животных моделях, показали, что гипергликемия при сахарном диабете приводит к усиленному апоптозу тимоцитов и снижению веса тимуса [118, р. 162]. Изменения в структуре и функции тимуса у людей при ожирении, патологическом состоянии, тесно связанным с СД2, приводят к повышенной эмиграции Т-клеток за счет CD4⁺ субпопуляции [142, р. 408]. Кроме того, результаты, представленные Yang H. и соавт. (2009), выявили, что при ожирении у людей тимопоэз снижается, а сахарный диабет 2 типа, сопровождающийся ожирением, не модифицирует тимический выброс независимо от ожирения [140, р. 3812]. Хорошо документировано, что снижение разнообразия Т-клеток связано с дисфункцией тимуса, а сниженный экспорт из тимуса, наблюдаемый у пожилых людей, был связан с повышенной восприимчивостью к инфекциям, аутоиммунным заболеваниям и злокачественными опухолями [283].

Метформин относится к наиболее часто используемым пероральным антидиабетическим средствам во всем мире и обладает уникальным механизмом действия, хорошей переносимостью и плейотропными эффектами, связанными с положительным влиянием на сердечно-сосудистую систему и профилактику поздних диабетических осложнений [20, р. 1379]. В

последнее время активно обсуждается значение метформина в профилактике и даже терапии онкологических заболеваний [25, р. 71583]. Механизм антиканцерогенной активности метформина до конца не выяснен, но в качестве основного молекулярного механизма указывается активация АМР-активированной протеинкиназы (АМРК), приводящая к модуляции белков, участвующих в некоторых биологических процессах, таких как трансляция белка, пролиферация клеток, синтез жирных кислот, ароматазы и синтез стеаринов. Метформин также действует на пролиферацию клеток через модуляцию инсулиновой сигнализации и регулирует повреждение ДНК и воспалительные реакции, нарушающие процессы репарации и активность ФНО- α [252, р. 270].

Имеются немногочисленные данные о влиянии метформина на иммунную систему в аспекте его потенциального противоопухолевого эффекта. Так, метформин был подтвержден в качестве средства, защищающего CD8⁺ опухоль-инфильтрирующие лимфоциты от апоптоза [28, р. 1814]. Установлено, что метформин восстанавливал генерацию CD8⁺ Т-клеток памяти при дефекте окисления жирных кислот [29, р. 107], а также ингибировал пролиферацию и выживание клеток при острой миелоидной лейкемии [30, р. 4273].

Принимая во внимание вышесказанное, мы в настоящей работе протестировали потенциал метформина в отношении модуляции тимического выброса, адекватность которого также важна, как и другой противоопухолевый механизм.

Нами проведена оценка тимического выброса Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа по следующим показателям: уровень TREC в мононуклеарных клетках периферической крови методом ПЦР в режиме реального времени и определение содержания тимических эмигрантов по экспрессии рецепторов к интерлейкину-7 - CD127 и CD132: недавних эмигрантов тимуса (CD127⁺CD132⁻), типичных эмигрантов (CD127⁺CD132⁺) и окончательно дифференцированных эмигрантов (CD127⁻CD132⁺) в субпопуляциях наивных, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии.

На сегодняшний день одним из способов проведения оценки количества RTE является определение кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles) [216, р. 404]. Образование этих молекулярных маркеров происходит во время формирования гена, кодирующего цепи Т-клеточного рецептора, путем реаранжировки пространственно удаленных генетических сегментов, т.е. «вырезанию» участков ДНК. Данные фрагменты ДНК замыкаются в кольца, которые при дальнейшем делении не удваиваются, поэтому постепенно их концентрации разбавляются. Поэтому частота TREC в РВМС была рекомендована как показатель тимического экспорта. Метод определения TREC в клинической практике зарекомендовал себя как наиболее точный анализ в диагностике, профилактике, а также в прогнозировании таких серьезных заболеваний

как ВИЧ-инфекция, иммунодефициты и злокачественные заболевания кроветворной системы [176, p. 694; 218, p. 829].

Результаты нашего исследования показали, что концентрация TREC в РВМС значительно ниже у пациентов с СД2 по сравнению с лицами без диабета, что согласуется с результатами ранних исследований [284]. Однако у больных, получавших метформин, частота TREC самая высокая среди всех групп больных диабетом, а именно при сравнении с пациентами, получавшими комбинацию инсулина с метформином, а также с пациентами, которые не получали антидиабетические препараты (лица с недавно диагностированным сахарным диабетом 2 типа). Эти данные позволили нам предположить, что у больных СД2 тимический выброс подавлен, в тоже время терапия метформином отчасти улучшает это нарушение.

Тем не менее, определение содержания TREC является косвенным показателем оценки тимического выброса, который также может зависеть от апоптоза TREC-содержащих клеток на периферии [285]. Учитывая этот факт, мы проанализировали характер эмиграции Т-клеток в периферической крови больных СД2, основываясь на экспрессии антигенов рецептора интерлейкина-7 - CD127 и 132 на Т-клетках: CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁺ (наивные), CD45⁺CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺CD3⁺CD8⁺, покидающие тимус.

Мы обнаружили, что процент RTE среди наивных Т-лимфоцитов в диабетических группах был ниже, чем у лиц без диабета, за исключением группы больных с монотерапией метформином. В этой группе тимический выброс, оцениваемый по концентрации CD45⁺CD3⁺RO⁺RA⁺CD127⁺132⁻ в периферической крови, не отличался от лиц, не страдающих диабетом. Следовательно, метформин можно рассматривать как фактор, который способен корректировать ухудшенный диабетом тимический выброс. Это предположение подтверждается тем фактом, что показатель средней интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity – MFI) рецептора CD127 на наивных Т-клетках у больных с диабетом был ниже, чем у лиц без диабета, в то время как у пациентов, леченных метформином, экспрессия CD127 на этих же клетках была выше, чем в других терапевтических группах с диабетом, и аналогична этому же показателю у недиабетических лиц.

При анализе распределения RTE в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки обнаружены интересные результаты: увеличение доли RTE среди CD4⁺ у всех больных с СД2 и особенно высокая доля в группе больных, леченных метформином, а процент CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD127⁺132⁻ был ниже в диабетических группах, чем в контроле (лица без сахарного диабета), а влияние метформина на содержание RTE отсутствовало. На основании этих данных можно предположить, что дефицит тимического выброса больных СД2 в основном определяется за счет CD8⁺ субпопуляции, компенсируемый повышенной эмиграцией RTE CD4⁺ Т-клеточной популяции.

При анализе распределения типичных эмигрантов, содержащие CD127⁺CD132⁺, выявлены изменения, подобные изменениям в RTE, в

субпопуляциях наивных и CD8⁺ Т-клеток, но не в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток. Так, относительное число этого типа тимических эмигрантов у всех больных СД2 было значительно снижено в CD4⁺ Т-клетках по сравнению с группой без диабета. Принимая во внимание эти результаты, а также наблюдения, выявленные в отношении CD127⁺CD132⁻ клеток, мы можем заключить, что эмиграция Т-клеток действительно замедлена у больных СД2, и этот дефицит Т-клеток в периферической крови можно объяснить следующими факторами: во-первых, дефицитом ранних и типичных эмигрантов в наивных Т-клетках, особенно в CD8⁺ Т-клетках, и, во-вторых, заторможенной дифференциацией из CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD132⁻ в CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD132⁺ после первого контакта с антигенами, или/и, прогрессивным апоптозом RTE в субпопуляции CD4⁺ клеток, которые подверглись гиперпролиферации при СД2 при переходе на более дифференцированную стадию – CD127⁺CD132⁺.

Результаты и значение следующей фракции эмигрантов тимуса CD127⁻CD132⁺ (окончательно дифференцированные) выявили, что содержание CD127⁻CD132⁺ клеток среди наивных и CD8⁺ Т-лимфоцитов увеличены у диабетических больных, в то время как экспрессия CD127⁻CD132⁺ на CD4⁺ Т-клетках не отличается от недиабетического контроля. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что RTE, особенно субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов, подвергаются более раннему контакту с антигенами и быстро конвертируются в окончательно дифференцированную CD127⁻CD132⁺ популяцию, которая подвергается гиперпролиферации. Экспорт RTE в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов при сахарном диабете первоначально увеличивается. Возможно, часть этих клеток элиминируются путем апоптоза, так как отмечается малочисленность CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD132⁺ клеточной популяции по отношению к контрольной группе, или RTE под воздействием интенсивных контактов с антигенами быстро преобразуются в окончательно дифференцированную CD127⁻CD132⁺ популяцию.

Следует отметить, что мы не выявили существенных различий в отношении RTE и CD127⁻CD132⁺ клеток среди Т-клеток памяти между больными разных групп СД2, а также между больными СД2 и лицами без диабета. Однако процент CD127⁻CD132⁺ среди активированных Т-клеток у больных СД2 был выше, чем у здоровых лиц. Эти данные подтверждают сделанные нами ранее вывод, что СД2 способствует более быстрой конвертации недавних эмигрантов тимуса в окончательно дифференцированные клетки, которые в последующем формируют Т-клетки памяти.

Принимая во внимание вышесказанное, можно констатировать, что метформин модифицирует большинство изменений, индуцированных диабетом. Наиболее очевидным фактом является нормализация содержания RTE и более дифференцированных клеток CD127⁺CD132⁺ среди наивных Т-клеток. Кроме того, обнаружено, что метформин способствует пролиферации RTE в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов, но не влияет на более

дифференцированные стадии. Вместе с тем метформин не повлиял на содержание ни одного из типов тимических эмигрантов, принадлежащих к CD8⁺ Т-клеточных популяций. Общая схема эмиграции Т-клеток, зависящая от сахарного диабета 2 типа и метформина, представлена на рисунке 18.

Выявленное в нашем исследовании влияние метформина на функцию тимуса скорее не связано с действием метформина на углеводный метаболизм у исследованных пациентов, так как значения HbA1c, 1,5-AG и гликемия натощак при монотерапии метформином были действительно более удовлетворительными, чем у больных, получавших комбинацию инсулина и метформина, но в большинстве случаев эти показатели были сходными с группой, не получавшей антидиабетических препаратов. Концентрации С-пептида, косвенно отражающего секрецию эндогенного инсулина, были сходными во всех исследуемых группах (больные СД2 и здоровые), что также дает основание считать, что инсулинзависимый эффект метформина не стоит рассматривать в качестве его потенциального механизма иммуномодулирующего действия.

В нормальных лимфоцитах АМПК контролирует клеточную выживаемость, опосредует клеточную активацию и метаболизм, ингибируя сигнальный путь mTOR, основная роль которого – участие в контроле инициации и трансляции синтеза белка в Т-клетках [271, р. 301]. Установлено, что ингибирование mTOR в наивных CD4⁺ Т-клетках способствует к образованию регуляторных Т-клеток, в то время как угнетение mTOR в наивных CD8⁺ Т-клетках способствует к образованию Т-клеток памяти [286]. Это может быть связано с тем, что метформин, являющийся активатором АМПК, индуцирует дифференциацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Частично наши наблюдения подтверждают эти данные, потому что мы фокусировали свое внимание на более ранней фазе развития CD4⁺ и CD8⁺ популяции после их выхода из тимуса. Наши результаты показали, что метформин не регулирует количество тимических эмигрантов, относящихся к CD8⁺ Т-лимфоцитам. Кроме того, эффекты метформина по увеличению частоты RTE и более дифференцированных CD127⁺CD132⁺ клеток в периферической крови, скорее всего, связаны с другими механизмами, а не ингибированием mTOR, который ограничивает пролиферацию клеток.

Эффект метформина на тимический выброс также не индуцировался интерлейкином-7 – цитокином, который регулирует созревание тимоцитов. Разницы в концентрации сывороточного уровня интерлейкина-7 во всех группах не было выявлено. Вместе с тем обращает на себя внимание показатель MFI для CD127 в различных популяциях клеток. Было обнаружено увеличение MFI для рецептора CD127 в наивных Т-клетках у больных, леченных метформином, по сравнению с другими диабетическими группами, и отсутствие различий по отношению к лицам без диабета. Значение MFI для CD127 в популяции CD4⁺ Т-клеток у больных, получавших метформин, было даже выше, чем в других исследуемых

группах. Можно предположить, что нормальный уровень интерлейкина-7 способен вызывать явный пролиферативный эффект в популяции RTE.

С другой стороны, эффект метформина на содержание недавних эмигрантов тимуса и их «потомков» также может быть рассмотрен как эффективный механизм, отвечающий за восстановление угнетенного ранее диабетом тимического выброса, продлевая время жизни RTE и CD127⁺CD132⁺ клеток, способствуя сохранению и поддержанию разнообразия T-клеточного рецептуара.

Обращает на себя внимание, что метформин-индуцированный эффект нормализации содержания RTE среди T-клеток у больных СД2 был угнетен инсулином при использовании его в комбинации с метформином. Принимая во внимание роль инсулина как фактора роста и выраженную экспрессию инсулиновых рецепторов на активированных T-клетках, можно предположить, что мы наблюдали скорее относительное, а не абсолютное снижение содержания RTE у пациентов, получавших комбинацию инсулина с метформином. Факторы роста, в том числе инсулин, потенцируют способность лимфоцитов к метаболическому переключению между состояниями покоя и пролиферации. Благодаря его способности усиливать поглощение питательных веществ инсулин способен поддерживать активированное состояние лимфоцитов, повышая пролиферацию T-клеток [287, 288]. Поэтому низкий процент RTE у больных, получавших инсулин в комбинации с метформином, может быть расценен как эффект увеличения количества активированных T-клеток, а не результат общего реального снижения количества RTE.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что сахарный диабет 2 типа подавляет функцию тимуса, а именно эмиграцию T-клеток из него. Снижение тимического выброса может быть компенсировано метформином, особенно в отношении CD4⁺ T-клеток [289], что является предпосылкой для дальнейшего изучения молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия метформина.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Концентрация T-рецепторных эксцизионных колец (TREC) в мононуклеарных клетках периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа достоверно снижена по отношению к лицам без диабета, монотерапия метформином по сравнению с другими видами антидиабетической терапии приводит к усилению тимической эмиграции, выражающееся в статистически значимом повышении уровня TREC.

2. При сахарном диабете 2 типа отмечается достоверное снижение содержания недавних эмигрантов тимуса (CD127⁺CD132⁻) в субпопуляциях наивных T-клеток и CD8⁺ T-лимфоцитов и достоверное увеличение их доли среди CD4⁺ T-клеток. На фоне лечения метформином у больных сахарным диабетом 2 типа наблюдается нормализация концентрации RTE в наивных T-клетках и достоверное увеличение их количества в субпопуляции CD4⁺

клеток (гиперпролиферация) по отношению к лицам без диабета, вместе с тем метформин не оказал влияния на содержание этой фракции эмигрантов среди CD8⁺ Т-клеток.

3. Содержание типичных эмигрантов CD127⁺ CD132⁺ в периферической крови у больных сахарным диабетом 2 типа во всех исследуемых субпопуляциях Т-клеток статистически значимо снижено по сравнению с лицами без диабета. Метформин оказал эффект только на популяцию наивных Т-клеток, достоверно повышая численность более дифференцированных эмигрантов.

4. Сахарный диабет 2 типа способствовал достоверному повышению содержания окончательно дифференцированных эмигрантов (CD127⁻CD132⁺) в периферической крови в субпопуляциях наивных и CD8⁺ Т-клеток, в тоже время действие метформина на этот вид эмигрантов во всех исследованных субпопуляциях Т-клеток отсутствовало.

5. У больных сахарным диабетом 2 типа эффект метформина на эмиграцию Т-клеток из тимуса не ассоциирован с действием интерлейкина-7.

Практические рекомендации:

1. С целью снижения риска развития злокачественных новообразований или их прогрессирования больным сахарным диабетом, кроме нормализации метаболических показателей, рекомендуется проводить оценку состояния иммунного статуса (уровень тимического выброса).

2. Метформин может быть рекомендован для дальнейшего клинического и экспериментального изучения в качестве препарата, полезного для контроля и нормализации функции тимуса в отношении коррекции ранней популяции тимических эмигрантов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas. 2015 // <http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/Atlas-poster-RU.pdf>.
- 2 Noto H., Goto A., Tsujimoto T., Osame K., Noda M. Latest insights into the risk of cancer in diabetes // *J Diabetes Investig.* – 2013. – Vol. 4. – P. 225-232.
- 3 Szablewski L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2014. – Vol. 30. – P. 543-553.
- 4 Искакова С.С., Уразаев О.Н., Бекмухамбетов Е.Ж., Дворацки Г. Современные взгляды на связь сахарного диабета 2 типа и злокачественных новообразований // *Наука и Здравоохранение.* – 2014. – №3(2). – С. 218-221.
- 5 International Agency for Research on Cancer // <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- 6 Shikata K., Ninomiya T., Kiyohara Y. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence // *Cancer Sci.* – 2013. – Vol. 104(1). – P. 9-14.
- 7 Vigneri P., Frasca F., Sciacca L., Pandini G., Vignery R. Diabetes and cancer // *Endocrine-Related Cancer.* – 2009. – Vol. 16(4). – P. 1103-1123.
- 8 Берштейн Л.М. Диабет, ожирение и онкологическая заболеваемость: риски и антириски // *Сахарный диабет.* – 2012. – №4. – P. 81-87.
- 9 Gristina V., Cupri M.G., Torchio M., Mezzogori C., Cacciabue L., Danova M. Diabetes and cancer: A critical appraisal of the pathogenetic and therapeutic links // *Biomed Rep.* – 2015. – Vol. 3(2). – P. 131-136.
- 10 Habib S.L., Rojna M. Diabetes and risk of cancer // *ISRN Oncol.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 583786.
- 11 Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 12(5). – P. 197.
- 12 Malchow S., Leventhal D.S., Nishi S. et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – P. 1219-1224.
- 13 Sasson S.C., Zaunders J.J., Zanetti G. et al. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection // *J Infect Dis.* – 2006. – Vol. 193(4). – P. 505-514.
- 14 Chao C., Page J.H. Type 2 diabetes mellitus and risk of non-Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis // *Am J Epidemiol.* – 2008. – Vol. 5. – P. 471-480.
- 15 Khan A.E., Gallo V., Linseisen J., Kaaks R. et al. Diabetes and the risk of non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition // *Haematologica.* – 2008. – Vol. 6. – P. 842-850.
- 16 Zhu Z., Zhang X., Shen Z., Zhong S. et al. Diabetes Mellitus and Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(2). – P. e 56662.

17 Sciacca L., Vigneri R., Tumminia A. et al. Clinical and molecular mechanisms favoring cancer initiation and progression in diabetic patients // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2013. – Vol. 23(9). – P. 808-815.

18 Adler A.I., Shaw E.J., Stokes T., Ruiz F. Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes: summary of NICE guidance // *BMJ.* – 2009. – Vol. 338. – P. 1668.

19 Nathan D.M., Buse J.B., Davidson M.B. et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 193-203.

20 Inzucchi S.E., Bergenstal R.M., Buse J.B. et al. American Diabetes Association (ADA); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) // *Diabetes Care.* – 2012. – Vol. 35. – P. 1364-1379.

21 Ben S.I., Laurent K., Loubat A. et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 3576-3586.

22 Дедов И.И., Бутрова С.А., Берковская М.А. Потенциальные возможности метформина в профилактике и лечении онкологических заболеваний у больных сахарным диабетом 2 типа // *Ожирение и метаболизм.* – 2011. – №1. – С. 40-49.

23 Diamanti-Kandarakis E., Economou F., Palimeri S., Christakou C. Metformin in polycystic ovary syndrome // *Ann N Y Acad Sci.* – 2009. – Vol. 1205. – P. 192-198.

24 Rotella C.M., Monami M., Mannucci E. Metformin beyond diabetes: new life for an old drug // *Curr Diabetes Rev.* – 2006. – Vol. 2. – P. 307-315.

25 Franciosi M., Lucisano G., Lapice E. et al. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes; systematic review // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(8). – P. 71583.

26 Anisimov V.N. Do metformin a real anticarcinogen? A critical reappraisal of experimental data // *Ann Transl Med.* – 2014. – Vol. 2(6). – P. 60.

27 Viollet B., Guigas B., Leclerc J. et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives // *ActaPhysiol (Oxf).* – 2009. – Vol. 196. – P. 81-98.

28 Eikawa S., Nishida M., Mizukami S. et al. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2015. – Vol. 112(6). – P. 1809-1814.

29 Pearce E.L., Walsh M.C., Cejas P.J. et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism // *Nature.* – 2009. – Vol. 460. – P. 103-107.

30 Green A.S., Chapuis N., Maciel T.T. et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the

repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – P. 4262-4273.

31 Iskakova S., Urazayev O., Bekmukhambetov E., Dworacki G. Cancer morbidity in patients with diabetes mellitus // *Экология. Радиация. Здоровье: матер. междунар. науч.-практ. конф.* – Семей, 2014. – С. 198.

32 Handelsman Y., Leroith D., Bloomgarden Z.T., Dagogo-Jack S. et al. AACE/ACE consensus statement. Diabetes and cancer // *Endocr Pract.* – 2013. – Vol. 19(4). – P. 675-693.

33 Burney S., Irfan K., Saif M.W., Masud F. Diabetes and pancreatic cancer // *JOP*. – 2014. – Vol. 15(4). – P. 319-321.

34 Elena J.W., Steplowski E., Yu K. et. al. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium // *Cancer Causes Control*. – 2013. – Vol. 24. – P. 13-25.

35 Joost H.G. Diabetes and cancer: epidemiology and potential mechanisms // *Diab Vasc Dis Res*. – 2014. – Vol. 11(6). – P. 390-394.

36 Liu J., Knezetic J.A., Strömmer L. et. al. The intracellular mechanism of insulin resistance in pancreatic cancer patients // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2000. – Vol. 85. – P. 1232-1238.

37 Wang P., Kang D., Cao W. et. al. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2012. – Vol. 2. – P. 109-122.

38 Yang W.S., Va P., Bray F. et. al. The Role of Pre-Existing Diabetes Mellitus on Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Prognosis: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. 27326.

39 Wang C., Wang X., Gong G. et. al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies // *Int J Cancer*. – 2012. – Vol. 7. – P. 1639-1648.

40 He J., Stram D.O., Kolonel L.N. et. al. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort // *Br J Cancer*. – 2010. – Vol. 1. – P. 120-126.

41 L.V. van de Poll-Franse, Haak H.R., Coebergh J.W.W. et. al. Disease-specific mortality among stage I–III colorectal cancer patients with diabetes: a large population-based analysis // *Diabetologia*. – 2012. – Vol. 8. – P. 2163-2172.

42 Mills K.T., Bellows C.F., Hoffman A.E. et. al. Diabetes Mellitus and Colorectal Cancer Prognosis: A Meta-analysis // *Dis Colon Rectum*. – 2013. – Vol. 11. – P. 1304-1319.

43 Larsson S.C., Mantzoros C.S., Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis // *Int J Cancer*. – 2007. – Vol. 121. – P. 856-862.

44 Patnaik J.L., Byers T., Di Guiseppi C. et. al. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study // *Breast Cancer Res*. – 2011. – Vol. 13. – P. 64.

- 45 Zhang Z.H., Su P.Y., Hao J.H., Sun Y.H. The role of preexisting diabetes mellitus on incidence and mortality of endometrial cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies // *Int J Gynecol Cancer*. – 2013. – Vol. 23. – P. 294-303.
- 46 James R.E., Lukanova A., Dossus L. et. al. Postmenopausal serum sex steroids and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a nested case-control study // *Cancer Prev Res (Phila)*. – 2011. – Vol. 4. – P. 1626-1635.
- 47 Allen N.E., Key T.J., Dossus L. et. al. Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) // *Endocr Relat Cancer*. – 2008. – Vol. 15. – P. 485-497.
- 48 Pears K.S., Barone B.B., Snyder C.F. et. al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis // *J Clin Oncol*. – 2011. – Vol. 29(1). – P. 40-46.
- 49 Bao C., Yang X., Xu W. et. al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of kidney cancer: a meta-analysis // *J Diabetes Complications*. – 2013. – Vol. 27. – P. 357-364.
- 50 El-Mosalamy H., Salman T.M., Ashmawey A.M., Osama N. Role of chronic E. coli infection in the process of bladder cancer- an experimental study // *Infect Agent Cancer*. – 2012. – Vol. 7. – P. 19.
- 51 Ragozzino M., Melton L.J., Chu C.P., Palumbo P.J. Subsequent cancer risk in the incidence cohort of Rochester, Minnesota, residents with diabetes mellitus // *J Chronic Dis*. – 1982. – Vol. 35(1). – P. 9-13.
- 52 Mitri J., Castillo J., Pittas A.G. Diabetes and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care*. – 2008. – Vol. 31(12). – P. 2391-2397.
- 53 Castillo J.J., Mull N., Reagan J.L. et al. Increased incidence of non-Hodgkin lymphoma, leukemia, and myeloma in patients with diabetes mellitus type 2: a meta-analysis of observational studies // *Blood*. – 2012. – Vol. 119(21). – P. 4845-4850.
- 54 Kasper J.S., Giovannucci E. A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2006. – Vol. 15. – P. 2056-2062.
- 55 Zhang F., Yang Y., Skrip L. et al. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis based on 12 case-control and 25 cohort studies // *Acta Diabetol*. – 2012. – Vol. 49(1). – P. 235-246.
- 56 Xu H., Jiang H.W., Ding G.X. et al. Diabetes mellitus and prostate cancer risk of different grade or stage: a systematic review and meta-analysis // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2013. – Vol. 99. – P. 241-249.
- 57 Corona G., Monami M., Rastrelli G. et al. Type 2 diabetes mellitus and testosterone: a meta-analysis study // *Int J Androl*. – 2011. – Vol. 34. – P. 528-540.
- 58 Lawlor D.A., Smith G.D., Ebrahim S. Hyperinsulinaemia and increased risk of breast cancer: findings from the British Women's Heart and Health Study // *Cancer Causes Control*. – 2004. – Vol. 15. – P. 267-275.

- 59 Godsland I.F. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer // *Clinical Science*. – 2010. – Vol. 118(5). – P. 315-332.
- 60 Gonzalez-Angulo A.M., Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer // *Clin Cancer Res*. – 2010. – Vol. 16(6). – P. 1695-1700.
- 61 Gotlieb W.H., Saumet J., Beauchamp M.C. et al. In vitro metformin antineoplastic activity in epithelial ovarian cancer // *Gynecol Oncol*. – 2008. – Vol. 110(2). – P. 246-250.
- 62 Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – Vol. 12(3). – P. 159-169.
- 63 Renehan A.G., Zwahlen M., Minder C. et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis // *Lancet*. – 2004. – Vol. 363. – P. 1346-1353.
- 64 LeRoith D., Yakar S. Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab*. – 2007. – Vol. 3. – P. 302-310.
- 65 Shaw L.M. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer // *Cell Cycle*. – 2011. – Vol. 10(11). – P. 1750-1756.
- 66 Lemke L.B., Rogers A.B., Nambiar P.R., Fox J.G. Obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus in Swiss-Webster mice associated with late-onset hepatocellular carcinoma // *J Endocrinol*. – 2008. – Vol. 199(1). – P. 21-32.
- 67 Chocarro-Calvo A., Garcia-Martinez J.M., Ardila-Gonzalez S. et al. Glucose-induced β -catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol Cell*. – 2013. – Vol. 49. – P. 474-486.
- 68 Pandey A., Forte V., Abdallah M. et al. Minerva I. Diabetes mellitus and the risk of cancer // *Endocrinol*. – 2011. – Vol. 3. – P. 187-209.
- 69 Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 17. – P. 1625-1638.
- 70 Jagers Jason R., Xuemei Sui, Steven P. Hooker et al. Metabolic syndrome and risk of cancer mortality in men // *European Journal of Cancer*. – 2009. – Vol. 45(10). – P. 1831-1838.
- 71 Giovannucci E., Harlan D.M., Archer M.C., Bergenstal R.M. et al. Diabetes and cancer: a consensus report // *Diabetes Care*. – 2010. – Vol. 33(7). – P. 1674-1685.
- 72 Griffiths R.I., Danese M.D., Gleeson M.L., Valderas J.M. Epidemiology and outcomes of previously undiagnosed diabetes in older women with breast cancer: an observational cohort study based on SEER-Medicare // *BMC Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 613.
- 73 Sainz J., Rudolph A., Hoffmeister M. et al. Effect of type 2 diabetes predisposing genetic variants on colorectal cancer risk // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2012. – Vol. 97(5). – P. 845-851.

74 Salopuro T., Pulkkinen L., Lindström J. et al. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study // *Int J Obes (Lond)*. – 2005. – Vol. 29(10). – P. 1245-1251.

75 Delahanty R.J., Beeghly-Fadiel A., Xiang Y.B. et al. Association of obesity-related genetic variants with endometrial cancer risk: a report from the Shanghai Endometrial Cancer Genetics Study // *Am J Epidemiol*. – 2011. – Vol. 174(10). – P. 1115-1126.

76 Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E. et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes // *Rev Diabet Stud*. – 2010. – Vol. 7. – P. 15-25.

77 Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer // *Obes Res Clin Pract*. – 2013. – Vol. 7. – P. 330-341.

78 Mannucci E. Insulin Therapy and Cancer in Type 2 Diabetes // *ISRN Endocrinol*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 240634.

79 Karlstad O., Starup-Linde J., Vestergaard P. et al. Use of insulin and insulin analogs and risk of cancer - systematic review and meta-analysis of observational studies // *Curr Drug Saf*. – 2014. – Vol. 8(5). – P. 333-348.

80 Colhoun H.M. On behalf of the SDRN Epidemiology Group Use of insulin glargine and cancer incidence in Scotland: a study from the Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group // *Diabetologia*. – 2009. – Vol. 52. – P. 1755-1765.

81 Currie C.J., Poole C.D., Gale E.A. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes // *Diabetologia*. – 2009. – Vol. 52(9). – P. 1766-1777.

82 Hemkens L. G., Grouven U., Bender R. et al. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study // *Diabetologia*. – 2009. – Vol. 52. – P. 1732-1744.

83 Home P.D., Lagarenne P. Combined randomised controlled trial experience of malignancies in studies using insulin glargine // *Diabetologia*. – 2009. – Vol. 52(12). – P. 2499-2506.

84 Phielix E., Szendroedi J., Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact // *Trends Pharmacol Sci*. – 2011. – Vol. 32. – P. 607-616.

85 Juurinen L., Kotronen A., Graner M., Yki-Järvinen H. Rosiglitazone reduces liver fat and insulin requirements and improves hepatic insulin sensitivity and glycemic control in patients with type 2 diabetes requiring high insulin doses // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2008. – Vol. 93(1). – P. 118-124.

86 Chintharlapalli S., Papineni S., Safe S. 1,1-Bis(3'indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes inhibit colon cancer cell and tumor growth through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent pathways // *Mol Cancer Ther*. – 2006. – Vol. 5. – P. 1362-1370.

87 Lefebvre A.M., Chen I., Desreumaux P. et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of

colon tumors in C57BL/6JAPCMin/+ mice // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4(9). – P. 1053-1057.

88 Monami M., Dicembrini I., Mannucci E. Thiazolidinediones and cancer: results of a meta-analysis of randomized clinical trials // *Acta Diabetol.* – 2014. – Vol. 51. – P. 91-101.

89 Bosetti C., Rosato V., Buniato D. et al. Cancer risk for patients using thiazolidinediones for type 2 diabetes: a meta-analysis // *Oncologist.* – 2013. – Vol. 18(2). – P. 148-156.

90 Jin S.M., Song S.O., Jung C.H. et al. Risk of bladder cancer among patients with diabetes treated with a 15 mg pioglitazone dose in Korea: a multi-center retrospective cohort study // *J Korean Med Sci.* – 2014. – Vol. 29(2). – P. 238-242.

91 Turner R.M., Kwok C.S., Chen C.T. et al. Thiazolidinediones and associated risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis // *Br J Clin Pharmacol.* – 2014. – Vol. 78(2). – P. 258-273.

92 Colmers I.N., Bowker S.L., Majumdar S.R., Johnson J.A. Use of thiazolidinediones and the risk of bladder cancer among people with type 2 diabetes: a meta-analysis // *CMAJ.* – 2012. – Vol. 184(12). – P. 675-683.

93 Mamtani R., Haynes K., Bilker W.B. et al. Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: a cohort study // *J Natl Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104. – P. 1411-1421.

94 Lutz S.Z., Staiger H., Fritsche A., Häring H. Antihyperglycaemic therapies and cancer risk // *Diabetes & Vascular Disease Research.* – 2014. – Vol. 11(6). – P. 371-389.

95 Ashcroft F.M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion // *J Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 2047-2058.

96 Thakkar B., Aronis K.N., Vamvini M.T. et al. Metformin and sulfonylureas in relation to cancer risk in type II diabetes patients: a meta-analysis using primary data of published studies // *Metabolism.* – 2013. – Vol. 62(7). – P. 922-934.

97 Singh S., Singh H., Singh P.P. et al. Antidiabetic medications and the risk of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2013. – Vol. 22(12). – P. 2258-2268.

98 Singh S., Singh P.P., Singh A.G. et al. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis // *Am J Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 108(6). – P. 881-891.

99 Pasello G., Urso L., Conte P., Favaretto A. Effects of sulfonylureas on tumor growth: a review of the literature // *Oncologist.* – 2013. – Vol. 18(10). – P. 1118-1125.

100 Tseng C.H., Lee K.Y., Tseng F.H. An updated review on cancer risk associated with incretin mimetics and enhancers // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* – 2015. – Vol. 33(1). – P. 67-124.

- 101 Drucker D.J. The biology of incretin hormones // *Cell Metab.* – 2006. – Vol. 3. – P. 153-165.
- 102 Drucker D.J. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis // *Mol Endocrinol.* – 2003. – Vol. 17. – P. 161-171.
- 103 Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients // *BMJ.* – 2005. – Vol. 330. – P. 1304-1305.
- 104 Bodmer M., Meier C., Krähenbühl S. et al. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer // *Diabetes Care.* – 2010. – Vol. 33(6). – P. 1304-1308.
- 105 Libby G., Donnelly L.A., Donnan P.T. et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32(9). – P. 1620-1625.
- 106 McFarland M.S., Cripps R. Diabetes mellitus and increased risk of cancer: focus on metformin and the insulin analogs // *Pharmacotherapy.* – 2010. – Vol. 30(11). – P. 1159-1178.
- 107 Oliveria S.A., Koro C.E., Yood M.U., Sowell M. Cancer incidence among patients treated with antidiabetic pharmacotherapy // *Diabetes. Metabol. Syndrome. Clin. Res. Reviews.* – 2008. – Vol. 2. – P. 47-57.
- 108 Decensi A., Puntoni M., Goodwin P. et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis // *Cancer Prev Res (Phila).* – 2010. – Vol. 3(11). – P. 1451-1461.
- 109 Noto H., Goto A., Tsujimoto T., Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7(3). – P. 33411.
- 110 Wang Z., Lai S.T., Xie L., Zhao J.D. et al. Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis // *Diabetes Res ClinPract.* – 2014. – Vol. 106(1). – P. 19-26.
- 111 Landman G.W., Kleefstra N., van Hateren K.J. et al. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16 // *Diabetes Care.* – 2010. – Vol. 33(2). – P. 322-326.
- 112 Hosono K., Endo H., Takahashi H. et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial // *Cancer Prev Res (Phila).* – 2010. – Vol. 3. – P. 1077-1083.
- 113 Niraula S., Stambolic V., Dowling R.J. et al. Clinical and biologic effects of metformin in early stage breast cancer // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70(24). – P. 03-06.
- 114 Chatamra K., Daniel P.M., Kendall M.D., Lam D.K. Atrophy of the thymus in rats rendered diabetic by streptozotocin // *Horm Metab Res.* – 1985. – Vol. 12. – P. 630-632.
- 115 Tabata T., Okuno Y., Fujii S., Kimura S., Kinoshita Y. Maturation impairment of thymic lymphocytes in streptozotocin-induced diabetes in rats // *Cell Immunol.* – 1984. – Vol. 89. – P. 250-258.

- 116 Mic A.A., Mic F.A., Tatu C.A. et al. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes // *Comp Med.* – 2007. – Vol. 57. – P. 476-481.
- 117 Gruia A.T., Barbu-Tudoran L., Mic A.A. et al. Arachidonic acid accumulates in the stromal macrophages during thymus involution in diabetes // *Histochem Cell Biol.* – 2011. – Vol. 136. – P. 79-92.
- 118 Goldfine A.B., Fonseca V., Shoelson S.E. Therapeutic approaches to target inflammation in type 2 diabetes // *Clin Chem.* – 2011. – Vol. 57(2). – P. 162-167.
- 119 Ip B.C., Hogan A.E., Nikolajczyk B.S. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of men and mice // *Trends Endocrinol Metab.* – 2015. – Vol. 26(2). – P. 91-100.
- 120 Pedicino D., Giglio A.F., Galiffa V.A. et al. Infections, immunity and atherosclerosis: pathogenic mechanisms and unsolved questions // *Int J Cardiol.* – 2013. – Vol. 166(3). – P. 572-583.
- 121 Dworacka M., Krzyżagórska E., Iskakova S. et al. Increased circulating RANTES in type 2 diabetes // *Eur. Cytokine Netw.* – Vol. 25(3). – 2014. – P. 46-51.
- 122 De Jong A.J., Kloppenburg M., Toes R.E., Ioan-Facsinay A. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 13(5). – P. 483.
- 123 Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 85-97.
- 124 Anderson E.K., Gutierrez D.A., Hasty A.H. Adipose tissue recruitment of leukocytes // *Curr Opin Lipidol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 172-177.
- 125 Fain J.N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review // *Mediators Inflamm.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 513948.
- 126 Boden G. Obesity and free fatty acids // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2008. – Vol. 37. – P. 635-636.
- 127 Perreault M., Roke K., Badawi A. et al. Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults // *Lipids.* – 2014. – Vol. 49(3). – P. 255-263.
- 128 Serhan C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways // *Annu Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 101-137.
- 129 Vinolo M.A., Rodrigues H.G., Nachbar R.T., Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids // *Nutrients.* – 2011. – Vol. 3. – P. 858-876.
- 130 Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes // *Nutrients.* – 2010. – Vol. 2. – P. 355-374.
- 131 Lima T.M., Kanunfre C.C., Pompeia C. et al. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flowcytometric analysis // *Toxicol In vitro.* – 2002. – Vol. 16. – P. 741-747.

132 Cury-Boaventura M.F., Gorjao R., de Lima T.M. et al. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78. – P. 1448-1456.

133 Boynton A., Neuhouser M.L., Wener M.H. et al. Associations between healthy eating patterns and immune function or inflammation in overweight or obese postmenopausal women // *Am J Clin Nutr.* – 2007. – Vol. 86. – P. 1445-1455.

134 Tanaka S., Isoda F., Yamakawa T. et al. T-lymphopenia in genetically obese rats // *Clin Immunol Immunopathol.* – 1998. – Vol. 86. – P. 219-225.

135 Nieman D.C., Henson D.A., Nehlsen-Cannarella S.L. et al. Influence of obesity on immune function // *J Am Diet Assoc.* – 1999. – Vol. 99. – P. 294-299.

136 Szamel M., Rehmann B., Krebs B., Kurrle R., Resch K. Activation signals in human lymphocytes. Incorporation of polyunsaturated fatty acids into plasma membrane phospholipids regulates IL-2 synthesis via sustained activation of protein kinase C // *J Immunol.* – 1989. – Vol. 143. – P. 2806-2813.

137 Rossetti R.G., Seiler C.M., DeLuca P. et al. Oral administration of unsaturated fatty acids: effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation // *J Leukoc Biol.* – 1997. – Vol. 62. – P. 438-443.

138 Stahl A., Gimeno R.E., Tartaglia L.A., Lodish H.F. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab.* – 2001. – Vol. 12. – P. 266-273.

139 Storch J., Thumser A.E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins // *BiochimBiophysAct.* – 2000. – Vol. 1486. – P. 28-44.

140 Yang H., Youm Y.H., Vandanmagsar B. et al. Obesity accelerates thymic aging // *Blood.* – Vol. 114. – 2009. – P. 3803-3812.

141 Moulin C.M., Marguti I., Peron J.P., Rizzo L.V., Halpern A. Impact of adiposity on immunological parameters // *Arq Bras Endocrinol Metabol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 183-189.

142 van der Weerd K., Dik W.A., Schrijver B. et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype // *Diabetes.* – 2012. – Vol. 61(2). – P. 401-408.

143 Yoshida K., Nakashima E., Kubo Y. et al. Inverse associations between obesity indicators and thymic T-cell production levels in aging atomic-bomb survivors // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(3). – P. 91985.

144 Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных сахарным диабетом типа 2 и ожирением // *Вопросы питания.* – 2012. – №5. – С. 60-65.

145 Кологривова И.В., Кошельская О.А., Сулова Т.Е., Карпов Р.С. Контроль гликемии, инсулинорезистентность и функциональная активность субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов у больных сахарным диабетом 2-го типа // *Российский кардиологический журнал.* – 2014. – №3(107). – С. 95-101.

146 Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging // *CurrTopPathol.* – 1986. – Vol. 75. – P. 43-88.

- 147 Nitta T., Murata S., Ueno T. et al. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation // *Adv Immunol.* – 2008. – Vol. 99. – P. 59-94.
- 148 Rothenberg E.V., Taghon T. Molecular genetics of T cell development // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 601-649.
- 149 Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection // *Nat Rev Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 127-135.
- 150 de Pooter R., Zuniga-Pflucker J.C. T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach // *Curr Opin Imm.* – 2007. – Vol. 19(2). – P. 163-168.
- 151 Berzins S.P., Uldrich A.P., Sutherland J.S. et al. Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks // *Trends Mol. Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 469-475.
- 152 Zachariah M.A., Cyster J.G. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction // *Science.* – 2010. – Vol. 328. – P. 1129-1135.
- 153 Яриллин А.А., Донецкова А.Д. Т-клетки недавние эмигранты тимуса // *Иммунология.* – 2012. – №6. – С. 326-334.
- 154 Houston E.G. Jr., Nechanitzky R., Fink P.J. Cutting edge: contact with secondary lymphoid organs drives postthymic T cell maturation // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 5213-5217.
- 155 Barbee S.D., Alberola-Ila J. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates thymic exit // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 1230-1238.
- 156 Mou F., Praskova M., Xia F. et al. The Mst1 and Mst2 kinases control activation of rho family GTPases and thymic egress of mature thymocytes // *J. Exp. Med.* – 2012. – Vol. 209(4). – P. 741-759.
- 157 Schacker T.W., Brenchley J.M., Beilman G.J. et al. Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naive CD4⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13(15). – P. 556-560.
- 158 Fink P.J. The Biology of Recent Thymic Emigrants // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 31-50.
- 159 Scollay R., Godfrey D.I. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today.* – 1995. – Vol. 16. – P. 268-273.
- 160 Xu X., Ge Q. Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2014. – Vol. 9. – P. e201403003.
- 161 Mc Caughy T.M., Wilden M.S., Hogquist K.A. Thymic emigration revisited // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204. – P. 2513-2520.
- 162 Bai A., Hu H., Yeung M., Chen J. Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 7632-7639.
- 163 Carlson C.M., Endrizzi B.T., Wu J. et al. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 299-302.

164 Scollay R.G., Butcher E.C., Weissman I.L. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice // Eur. J. Immunol. – 1980. – Vol. 10. – P. 210-218.

165 Egerton M., Scollay R., Shortman K. Kinetics of mature T cell development in the thymus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1990. – Vol. 87. – P. 2579-2582.

166 Vrisekoop N., den Braber I., de Boer A.B. et al. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 6115-6120.

167 Den Braber I., Mugwagwa T., Vrisekoop N. et al. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans // Immunity. – 2012. – Vol. 36. – P. 288-297.

168 Aspinall R., Andrew D. Thymic involution in aging // J. Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 20. – P. 250-256.

169 Zoller A.L., Schnell F.J., Kersh G.J. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration // Immunology. – 2007. – Vol. 121. – P. 207-215.

170 Chinn I.K., Blackburn C.C., Manley N.R., Sempowski G.D. Changes in primary lymphoid organs with aging // Semin. Immunol. – 2012. – Vol. 24(5). – P. 309-320.

171 Berzins S.P., Godfrey D.I., Miller J.F.A.P., Boyd R.L. A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96(17). – P. 9787-9791.

172 Hale J.S., Boursalian T.E., Turk G.L., Fink P.J. Thymic output in aged mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 8447-8452.

173 Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus // Nat Rev Immunol. – 2002. – Vol. 2(10). – P. 760-772.

174 Fink P.J., Hendricks D.W. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality // Nat Rev Immunol.- 2011. – Vol. 11(8). – P. 544-549.

175 Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion // Semin. Immunol. – 1997. – Vol. 9. – P. 339-346.

176 Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection // Nature. – 1998. – Vol. 396. – P. 690-695.

177 Уразаев О.Н., Искакова С.С., Дворацки Г. Изучение тимического выброса у больных сахарным диабетом 2 типа // Научные открытия в эпоху глобализации: сб. статей VII-й междунар. науч.-практ. конф. – 2015. – Казань, Россия. – С. 142-146.

178 Haines C.J., Giffon T.D., Lu L.S. et al. Human CD4⁺ Tcell recent thymic emigrants are identified by proteintyrosinekinase 7 and have reduced immune function // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206. – P. 275-285.

179 Lynch H.E., Goldberg G.L., Chidgey A. et al. Thymic involution and immune reconstitution // Trends Immunol. – 2009. – Vol. 30. – P. 366-373.

180 Gurkan S., Luan Y., Dhillon N. et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10. – P. 2132-2141.

181 Bloemers B.L.P., Bont L., de Weger R.A. et al. Decreased thymic output accounts for decreased naive T cell numbers in children with Down Syndrome // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186. – P. 4500-4507.

182 Heitger A., Greinix H., Mannhalter C. et al. Requirement of residual thymus to restore normal T cell subsets after human allogeneic bone marrow transplantation // *Transplantation.* – 2000. – Vol. 69. – P. 2366-2373.

183 Roux E., Dumont-Girard F., Starobinski M. et al. Recovery of immune reactivity after T cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity // *Blood.* – 2000. – Vol. 96. – P. 2299-2303.

184 Talvensaari K., Clave E., Douay C. et al. Abroad T cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 1458-1464.

185 Toubert A., Glauzy S., Douay C., Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again // *Tissue Antigens.* – 2012. – Vol. 79. – P. 83-89.

186 Murano P.A., Douek D.C., Packer A. et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201. – P. 805-816.

187 Sauce D., Larsen M., Fastenackels S. et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood // *J. Clin. Investig.* – 2009. – Vol. 119. – P. 3070-3078.

188 Goronzy J., Weyand C.M. Thymic function and peripheral T cell homeostasis in rheumatoid arthritis // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22. – P. 251-255.

189 Сайдакова Е.В. Роль инфекции вирусным гепатитом С в нарушении продуктивной функции тимуса у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне иммунологически неэффективной антиретровирусной терапии // *Медицинская иммунология.* – 2013. – Т. 15, №6. – С. 545-554.

190 Yang Y., Al-Mozaini M., Buzon M.J. et al. CD4 T cell regeneration in HIV-1 elite controllers // *AIDS.* – 2012. – Vol. 26. – P. 701-706.

191 Steffens C.M., Smith K.Y., Landay A. et al. T-cell receptor excision circle (TREC) content following maximum HIV suppression is equivalent in HIV-infected and HIV-uninfected individuals // *AIDS.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1757-1764.

192 Teixeira L., Valdez H., McCune J.M. et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function // *AIDS.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1749-1756.

193 Douek D.C., Betts M.R., Hill B.J. et al. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 6663-6668.

- 194 Fabre-Mersseman V., Dutrieux J., Louise A. et al. CD4+ recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis // AIDS. – 2011. – Vol. 25. – P. 1153-1162.
- 195 Butcher E.C., Scollay R.G., Weissman I.L. Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate. II. Potential application to studies of lymphocyte migration and maturation // J. Immunol. Methods. – 1980. – Vol. 37. – P. 109-121.
- 196 Hale J.S., Fink P.J. Back to the thymus: peripheral T cells come home // Immunol. Cell Biol. – 2009. – Vol. 87. – P. 58-64.
- 197 Tough D.F., Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells // The Journal of experimental medicine. – 1994. – Vol. 179. – P. 1127-1135.
- 198 Hassan J., Reen D.J. Human recent thymic emigrants-identification, expansion, and survival characteristics // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – P. 1970-1976.
- 199 Cooper C.J., Orr M.T., McMahan C.J., Fink P.J. T cell 1 receptor revision does not solely target recent thymic emigrants // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 226-233.
- 200 Boursalian T.E., Golub J., Soper D.M., Cooper C.J., Fink P.J. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery // Nat. Immunol. – 2004. – Vol. 5. – P. 418-425.
- 201 Kong F.K., Chen C.L., Cooper M.D. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation // Immunity. – 1998. – Vol. 8. – P. 97-104.
- 202 Junge S., Kloechener-Gruissem B., Zufferey R. et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1)CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37. – P. 3270-3280.
- 203 Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets // Blood. – 2009. – Vol. 113. – P. 769-774.
- 204 Tanaskovic S., Fernandez S., Price P., Lee S., French M.A. CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+T-cells or $\gamma\delta$ T-cells, in HIV patients responding to ART // Immunol. Cell Biol. – 2010. – Vol. 88. – P. 321-327.
- 205 Lewis D.B., Haines C., Ross D. Protein tyrosine kinase 7: a novel surface marker for human recent thymic emigrants with potential clinical utility // J. Perinatol. – 2011. – Vol. 31(1). – P. 72-81.
- 206 Lev A., Simon A.J., Broidas A. et al. Thymic function in MHC class II-deficient patients // J. Allergy Clin. Immunol. – 2012. – Vol. 6749(12). – P. 01761-07617.
- 207 Исакова С.С., Уразаев О.Н., Бекмухамбетов Е.Ж., Дворацки Г. Значение определения ТREC (T-cell receptor excision circles) в диагностике и прогнозировании заболеваний // Наука и Здоровоохранение. – 2013. – №6. – С. 13-16.

208 Somech R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders // *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* – 2011. – Vol. 11(6). – P. 517-524.

209 Yin L., Rodriguez C.A., Hou W. et al. Antiretroviral therapy corrects HIV-1-induced expansion of CD8 β CD45RA β CD2- CD11a(bright) activated T cells // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. – Vol. 122(1). – P. 166-172.

210 Донецкова А.Д., Ярилин А.А. Т-рецепторные эксцизионные кольца и значимость их определения в клинике // *Иммунология.* – 2013. – №4. – С. 220-225.

211 Livak F., Schatz D.G. T-cell receptor alpha locus V (D) J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells // *Mol Cell Biol.* – 1996. – Vol. 16. – P. 609-618.

212 Haddad E., Landais P., Friedrich W. et al. Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients // *Blood.* – 1998. – Vol. 91. – P. 3646-3653.

213 Sairafi D., Mattsson J., Uhlin M., Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival // *Clin Immunol.* – 2012. – Vol. 142(3). – P. 343-350.

214 Copelan E.A. Hematopoietic stem-cell transplantation // *N Engl J Med.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1813-1826.

215 Douek D.C., Vescio R.A., Betts M.R. et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution // *Lancet.* – 2000. – Vol. 355. – P. 1875-1881.

216 Somech R., Lev A., Simon A.J. et al. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study // *Isr Med Assoc J.* – 2013. – Vol. 15(8). – P. 404-409.

217 Adeli M.M., Buckley R.H. Why newborn screening for severe combined immunodeficiency is essential: a case report // *Pediatrics.* – 2010. – Vol. 126. – P. 465-469.

218 Morinishi Y., Imai K., Nakagawa N. et al. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards // *J Pediatr.* – 2009. – Vol. 155. – P. 829-833.

219 McGhee S.A., Stiehm E.R., Cowan M. et al. Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency // *Mol Genet Metab.* – 2005. – Vol. 86. – P. 427-430.

220 Baker M.W., Grossman W.J., Laessig R.H. et al. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency // *J Allergy Clin Immunol.* – 2009. – Vol. 124. – P. 522-527.

221 Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D. et al. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection // *Annu Rev Immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 529-560.

222 Anselmi A., Vendrame D., Rampon O. et al. Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different

virological responses to antiretroviral therapy // *Clin Exp Immunol.* – 2007. – Vol. 150. – P. 442-450.

223 Ye P., Kirschner D.E. Reevaluation of T-cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants // *J Immunol.* - 2002. – Vol. 168(10). – P. 4968-4979.

224 Link A., Vogt T.K., Favre S. et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1255-1265.

225 Mazzucchelli R.I., Warming S., Lawrence S.M. et al. Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4. – P. 7637.

226 Le Campion A., Bourgeois C., Lambolez F. et al. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2002. – Vol. 99. – P. 4538-4543.

227 Min B., McHugh R., Sempowski G.D. et al. Neonates support lymphopenia-induced proliferation // *Immunity.* – 2003. – Vol. 18. – P. 131-140.

228 Swainson L., Kinet S., Mongellaz C. et al. Taylor N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway // *Blood.* – 2007. – Vol. 109. – P. 1034-1042.

229 Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29. – P. 848-862.

230 ElKassar N., Gress R.E. An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy // *J. Immunotoxicol.* – 2010. – Vol. 7. – P. 1-7.

231 Lundstrom W., Fewkes N.M., Mackall C.L. IL-7 in human health and disease // *Semin. Immunol.* – 2012. – Vol. 24. – P. 218-224.

232 Gao J., Zhao L., Wan Y.Y., Zhu B. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 16(5). – P. 10267-10280.

233 Jiang Q., Li W.Q., Aiello F.B. et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2005. – Vol. 16. – P. 513-533.

234 Schuluns K.S., Kieper W.C., Jameson S.C., Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo // *Nat Immunol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 426-432.

235 Tan J.T., Dudl E., LeRoy E. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 8732-8737.

236 Puel A., Ziegler S.F., Buckley R.H., Leonard W.J. Defective IL7R expression in T^H1⁺NK⁺ severe combined immunodeficiency // *Nat Genet.* – 1998. – Vol. 20. – P. 394-397.

237 Buckley R.H., Schiff R.I., Schiff S.E. et al. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants // *J Pediatr.* – 1997. – Vol. 130. – P. 378-387.

238 Russell S.M., Tayebi N., Nakajima H. et al. Mutation of Jak 3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development // *Science*. – 1995. – Vol. 270. – P. 797-800.

239 Roifman C.M., Zhang I., Chitayat D., Sharfe N. A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 2803-2807.

240 Kittipatarin C., Khaled A.R. Interlinking interleukin-7 // *Cytokine*. – 2007. – Vol. 39. – P. 75-83.

241 Taniichi Sh., Shimba A., Wagatsuma K. et al. Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – Vol. 110(2). – P. 612-617.

242 Fujita N., Sato S., Katayama K., Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization // *J. Biol. Chem*. – 2002. – Vol. 277. – P. 28706-28713.

243 Sasson S.C., Zaunders J.J., Seddiki N. et al. Progressive activation of CD127+132- recent thymic emigrants into terminally differentiated CD127-132+ T-cells in HIV-1 infection // *PLoSOne*. – 2012. – Vol. 7(2). – P. 31148.

244 Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) / UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // *Lancet*. – 1998. – Vol. 352. – P. 854-865.

245 Cusi K., Consoli A., DeFronzo R.A. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus // *J ClinEndocrinolMetab*. – 1996. – Vol. 81. – P. 4059-4067.

246 Hundal R.S., Krssak M., Dufour S. et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49. – P. 2063-2069.

247 Kirpichnikov D., McFarlane S.I., Sowers J.R. Metformin: an update // *Ann Intern Med*. – 2002. – Vol. 137(1). – P. 25-33.

248 Bailey C.J., Puah J.A. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle // *Diabetes Metab*. – 1986. – Vol. 12 – P. 212-218.

249 Bailey C.J., Turner R.C. Metformin // *N Engl J Med*. – 1996. – Vol. 334. – P. 574-579.

250 Уразаев О.Н., Искакова С.С., Бекмухамбетов Е.Ж. и др. Современное представление о молекулярных механизмах метформина // *Наука и Здравоохранение*. – 2015. – №2. – С. 19-29.

251 Oakhill J.S., Steel R., Chen Z.P., Scott J.W., Ling N., Tam S., Kemp B. E. AMPK is a direct adenylatecharge-regulated protein kinase // *Science*. – 2011. – Vol. 332. – P. 1433-1435.

252 Viollet B., Guigas B., Sanz Garcia N. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. – 2012. – Vol. 122(6). – P. 253-270.

253 Xiao B., Sanders M.J., Underwood E. et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP // *Nature*. – 2011. – Vol. 472. – P. 230-233.

254 Shaw R.J., Lamia K.A., Vasquez D. et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin // *Science*. – 2005. – Vol. 310(5754). – P. 1642-1646.

255 Foretz M., Hebrard S., Leclerc J. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state // *J Clin Invest*. – 2010. – Vol. 120. – P. 2355-2369.

256 Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 108. – P. 1167-1174.

257 Menendez J.A., Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis // *Nature Reviews Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – P. 763-777.

258 Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia // *Nature Reviews. Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – P. 915-928.

259 Dowling R.J., Goodwin P.J., Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment // *BMC Med*. – 2011. – Vol. 9. – P. 33.

260 Галстян Г.Р. Риск онкологических заболеваний у больных сахарным диабетом // *Сахарный диабет*. – 2009. - №4. – С. 105-107.

261 Ben Q., Xu M., Ning X., Liu J. et al. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies // *Eur J Cancer*. – 2011. – Vol. 47(13). – P. 1928-1937.

262 Miyoshi H., Kato K., Iwama H. et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo // *Int J Oncol*. – 2014. – Vol. 45(1). – P. 322-332.

263 Li W., Yuan Y., Huang L., Qiao M., Zhang Y. Metformin alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2012. – Vol. 96. – P. 187-195.

264 Kobayashi M., Kato K., Iwama H. et al. Antitumor effect of metformin in esophageal cancer: in vitro study // *Int J Oncol*. – 2013. – Vol. 42. – P. 517-524.

265 Kato K., Gong J., Iwama H., Kitanaka A. et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo // *Mol Cancer Ther*. – 2012. – Vol. 11. – P. 549-560.

266 Avci C.B., Harman E., Dodurga Y. et al. The therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2013. – Vol. 14. – P. 765-768.

267 Kai Y., Peng W., Ling W. et al. Reciprocal effects between microRNA-140-5p and ADAM10 suppress migration and invasion of human tongue cancer cells // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2014. – Vol. 448. – P. 308-314.

268 Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *Embo Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 4. – P. 143-159.

269 MacIver N.J., Blagih J., Saucillo D.C. et al. The Liver Kinase B1 Is a Central Regulator of T Cell Development, Activation, and Metabolism // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187. – P. 4187-4198.

270 Zarrouk M., Finlay D.K., Foretz M. et al. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase independent effects of metformin in T cells // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(9). – P. 106710.

271 Powell J.D., Delgoffe G.M. The Mammalian Target of Rapamycin: Linking T Cell Differentiation, Function, and Metabolism // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33. – P. 301-311.

272 Исакова С.С., Уразаев О.Н., Бекмухамбетов Е.Ж. и др. Иммуномодулирующее действие метформина при монотерапии сахарного диабета 2 типа субпопуляций Т-лимфоцитов // Сб. II-го междунар. конгр. «Профилактика и лечение метаболических нарушений и сосудистых заболеваний. Междисциплинарный подход». – М., 2014. – С. 47.

273 Rydén L., Grant P.J., Anker S.D. et al. Cguidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD - summary / Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD) // *DiabVasc Dis Res*. – 2014. – Vol. 11(3). – P. 133-173.

274 Weykamp C., John W.G., Mosca A. et al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report // *Clin Chem*. – 2008. – Vol. 54(2). – P. 240-248.

275 Dungan K.M., Buse J.B., Largay J. et al. 1,5 -anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by continuous glucose monitoring system in moderately controlled patients with diabetes // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29. – P. 1214-1219.

276 Dworacka M., Winiarska H. The application of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol for monitoring type 2 diabetic patients // *Dis Markers*. – 2005. – Vol. 21(3). – P. 127-132.

277 Berthold F. Isolation of human monocytes by Ficoll density gradient centrifugation // *Blut*. – 1981. – Vol. 43(6). - P. 367-371.

278 Amariglio N., Lev A., Simon A. et al. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency // *Pediatr Res*. – 2010. – P. 67(2). – P. 211-216.

279 Motta M., Chiarini M., Ghidini C. et al. Quantification of newly produced B and T lymphocytes in untreated chronic lymphocytic leukemia patients // *J Transl Med*. – 2010. – Vol. 8. – P. 111.

280 Sottini A., Ghidini C., Zanotti C. et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation // *Clin Immunol*. – 2010. – Vol. 136(2). – P. 217-227.

281 Krenger W., Schmidlin H., Cavadini G., Holländer G.A. On the relevance of TCR rearrangement circles as molecular markers for thymic output during experimental graft-versus-host disease // *J Immunol*. – 2004. – Vol. 172(12). – P. 7359-7367.

282 Ryu T.Y., Park J., Scherer P.E. Hyperglycemia as a risk factor for cancerprogression // *Diabetes Metab J*. – 2014. – Vol. 38(5). – P. 330-336.

283 Aw D., Silva A.B., Palmer D.B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population // *Immunology*. – 2007. – Vol. 120. – P. 435-446.

284 Искакова С.С., Уразаев О.Н., Бекмухамбетов Е.Ж. и др. Изменения количества TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES) у больных сахарным диабетом 2 типа // *GeorGian Medical news*. – 2015. – Vol. 7-8. – P. 244-245.

285 Nikolich-Zugich J., Slifka M.K., Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 123-132.

286 Xu X., Ye L., Araki K., Ahmed R. mTOR, linking metabolism and immunity // *SeminImmunol.* – 2012. – Vol. 24(6). – P. 429-435.

287 Fox C.J., Hammerman P.S., Thompson C.B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response // *Nat Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 5(11). – P. 844-852.

288 Maciver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L. et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival // *J Leukoc Biol.* – 2008. – Vol. 84(4). – P. 949-957.

289 Dworacki G., Urazayev O., Bekmukhambetov Y. et al. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin // *Immunology*. – 2015. – Vol. 146(3). – P. 456-469.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-воспитательной работе
ЗКГМУ им. Марата Оспанова
Тусупкалиев А.Б.
«25» _____ 2015 г.



АКТ
внедрения результатов научных исследований в учебный процесс
№ 424 « 25 » 08 2015 г.

Основание: выписка из протокола заседания кафедры онкологии и визуальной диагностики № 6 от «30» 01 2015 г.

выписка из протокола заседания КОП по специальности «Общая медицина» № 5 от 16.02 2015 г.

Место проведения: ЗКГМУ им. Марата Оспанова, кафедра онкологии и визуальной диагностики.

Наименование предложения: внедрение в образовательный процесс результатов клинического исследования PhD-докторанта Уразаева О.Н. по теме докторской диссертации «Оценка эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином».

Работа выполнена: в рамках образовательной программы подготовки доктора философии (PhD) по специальности 6D110100-«Медицина» научно-педагогического направления.

Специальность: «Общая медицина (4, 6, 7 курсы)».

Дисциплины: «онкология», модуль «онкогинекология».

Содержание внедрения: доказано, что сахарный диабет 2 типа способствует повышению риска развития злокачественных новообразований, снижая иммунологический надзор. В диссертационной работе выявлено, что улучшает иммунологический статус, играющий важную роль в развитии и прогрессии злокачественных новообразований. Метформин нормализует измененную при СД2 эмиграцию Т-клеток из тимуса, что выражается в повышении уровня Т-рецепторных эксцизионных колец в мононуклеарных клетках периферической крови и ранних эмигрантов тимуса. Результаты исследования внедрены в лекционный материал и занятие по теме «Факторы риска и профилактика злокачественных новообразований. Государственные скрининговые программы» по дисциплине «онкология» и модуль «онкогинекология» специальности «Общая медицина».





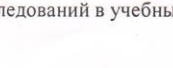

Исполнитель: ППС кафедры, Уразаев О.Н.

Сроки внедрения: 2014-2015 учебный год

Эффективность внедрения: Результаты внедрения позволили расширить знания студентов об иммуномодулирующем свойстве метформина, необходимом для снижения риска развития злокачественных новообразований у больных сахарным диабетом 2 типа.

Предложения, замечания, осуществляющего внедрение: кафедра онкологии и визуальной диагностики рекомендует продолжить исследование по изучению иммуномодулирующего и антиканцерогенного эффектов метформина у больных сахарным диабетом 2 типа с наличием или отсутствием злокачественных опухолей.

Руководитель кафедры онкологии и визуальной
диагностики
Председатель Комитета образовательных программ
по специальности «Общая медицина»
Руководитель ДУМР
Исполнители

 Койшыбаев А.К.
 Алмагамбетова А.С.
 Дильмагамбетов Д.С.
 Дюсембеков С.Т.
 Бегунов В.В.
 Уразаев О.Н.

Н БҚММУ 705-50-12. Оқу процесіне ғылыми зерттеу нәтижелерін енгізу актісі. Бірінші басылым.
Ф ЗКГМУ 705-50-12. Акт внедрения результатов научных исследований в учебный процесс. Издание третье.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-воспитательной работе
ЗКГМУ им. Марата Оспанова
А.Б. Тусупкалиев
« 25 » 06 2015 г.

АКТ

внедрения результатов научных исследований в учебный процесс

№ 425 « 25 » 06 2015 г.

Основание: выписка из протокола заседания кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии № 6 от « 08 » 01 2015 г.; выписка из протокола заседания КОП по специальности «Общая медицина» № 5 от « 16 » 02 2015 г.

Место проведения: ЗКГМУ им. Марата Оспанова, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Наименование предложения: внедрение в образовательный процесс результатов клинического исследования PhD-докторанта Уразаева О.Н. по теме диссертации «Оценка эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином».

Работа выполнена: в рамках образовательной программы подготовки доктора философии (PhD) по специальности 6D110100-«Медицина» научно-педагогического направления.

Специальность: «Общая медицина».

Дисциплина: «Общая иммунология».

Содержание внедрения: В диссертационной работе выявлено, что у больных сахарным диабетом 2 типа отмечается изменение Т-клеточного иммунитета, а именно снижение тимического выброса, что подтверждается снижением в периферической крови концентрации Т-рецепторных эксцизионных колец и изменение числа ранних эмигрантов тимуса в субпопуляции наивных, CD4⁺ CD8⁺ Т-клеток. Эта дисфункция может быть компенсирована метформином, особенно в отношении CD4⁺ наивных Т-клеток. Результаты исследования рекомендуется внедрить в лекционный материал и практическое занятие по теме: «Система клеточного иммунитета. Иммунологическая толерантность. Методы оценки Т-системы иммунитета» по дисциплине «Общая иммунология» для студентов 3 курса специальности «Общая медицина».

Исполнитель: ППС кафедры, Уразаев О.Н.

Сроки внедрения: 2014-2015 учебный год.

Эффективность внедрения: Результаты внедрения позволили расширить знания студентов об изменениях Т-клеточного иммунитета при сахарном диабете.

Предложения, замечания, осуществляющего внедрение: кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии рекомендует продолжить исследование по изучению действия метформина на иммунный статус.

Руководитель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии

Засорин Б.В.

Председатель Комитета образовательных программ по специальности «Общая медицина»

Алмагамбетова А.С.

Руководитель ДУМР

Дильмагамбетов Д.С.

Исполнители

Жарасов М.Ж.
Уразаев О.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-воспитательной работе
ЗКГМУ им. Марата Оспанова
А.Б. Гусупкалиев
2015 г.



АКТ
внедрения результатов научных исследований в учебный процесс
№ 422 «25» 06 2015 г.

Основание: выписка из протокола заседания кафедры фармакологии № 10 от «16» 01 2015 г.

выписка из протокола заседания КОП по специальности «Общая медицина» № 5 от 16.02 2015 г.

Место проведения: ЗКГМУ им. Марата Оспанова, кафедра фармакологии.

Наименование предложения: внедрение в образовательный процесс результатов клинического исследования PhD-докторанта Уразаева О.Н. по теме докторской диссертации «Оценка эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином».

Работа выполнена: в рамках образовательной программы подготовки доктора философии (PhD) по специальности 6D110100-«Медицина» научно-педагогического направления.

Специальность: «Общая медицина».

Дисциплина: «Фармакология-2».

Содержание внедрения: В диссертации установлено, что метформин способствовал нормализации функции тимуса, а именно тимического выброса, что в дальнейшем может быть использовано как для профилактики, так и для снижения прогрессирования злокачественных новообразований у больных сахарным диабетом 2 типа. Результаты исследования Уразаева О.Н. внедрены в лекционный материал и занятие по теме «Лекарственные средства, применяемые при гипергликемии и гипогликемии, синдроме надпочечниковой недостаточности» по дисциплине «Фармакология-2» специальности «Общая медицина».






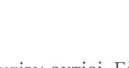
Исполнитель: ППС кафедры, Уразаев О.Н.

Сроки внедрения: 2014-2015 учебный год

Эффективность внедрения: Результаты внедрения позволили расширить знания студентов о фармакологических свойствах метформина.

Предложения, замечания, осуществляющего внедрение: кафедра фармакологии рекомендует проводить исследования по изучению молекулярного механизма действия метформина при измененном иммунном статусе.

Руководитель кафедры фармакологии
Председатель Комитета образовательных программ
по специальности «Общая медицина»
Руководитель ДУМР
Исполнители

 Исакова С.С.
 Алмагамбетова А.С.
 Дильмагамбетов Д.С.
 Нургалиева Ж.Ж.
 Чуканова Г.Н.
 Уразаев О.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-воспитательной работе
ЗКГМУ им.Марата Оспанова
Тусункалиев А.Б.
2015 г.



АКТ
внедрения результатов научных исследований в учебный процесс
№ 430 «25» 06 2015 г.

Основание: выписка из протокола заседания кафедры фармакологии №10 от «16.01» 2015 г.;

выписка из протокола заседания КОП по специальностям «Общественное здравоохранение», «Медико-профилактическое дело», «Фармация» №3 от 18.02.2015 г.

Место проведения: ЗКГМУ им.Марата Оспанова, кафедра фармакологии.

Наименование предложения: внедрение в образовательный процесс результатов клинического исследования PhD-докторанта Уразаева О.Н. по теме докторской диссертации «Оценка эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа, леченных метформином».

Работа выполнена: в рамках образовательной программы подготовки доктора философии (PhD) по специальности 6D110100-«Медицина» научно-педагогического направления.

Специальность: «Фармация».

Дисциплина: «Фармакология».

Содержание внедрения: В диссертации выявлено, что метформин нивелирует дисбаланс клеточного иммунитета, нормализуя эмиграцию Т-клеток у больных сахарным диабетом 2 типа, что способствует снижению риска развития злокачественных опухолей при сахарном диабете. Результаты исследования Уразаева О.Н. внедрены в лекционный материал и практическое занятие по теме: «Лекарственные средства, влияющие на систему крови, обмен веществ, воспаление и иммунные процессы» по дисциплине «Фармакология» для студентов специальности «Фармация».

Исполнитель: ППС кафедры, Уразаев О.Н.

Сроки внедрения: 2014-2015 учебный год


Эффективность внедрения: Результаты внедрения позволили расширить знания студентов о фармакологических свойствах метформина.

Предложения, замечания, осуществляющего внедрение: кафедра фармакологии рекомендует продолжить исследования по изучению метформина на иммунные процессы у других категорий лиц.

Руководитель кафедры фармакологии

 Исакова С.С.



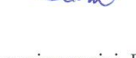
Председатель Комитета образовательных программ по специальностям «Общественное здравоохранение», «Медико-профилактическое дело», «Фармация»

 Уразаева С.Т.

Руководитель ДУМР

 Дильмагамбетов Д.С.

Исполнители

 Нургалиева Ж.Ж.
 Чуканова Г.Н.
 Уразаев О.Н.