

Федеральное агентство научных организаций  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук»



**Научно-исследовательский институт кардиологии**

Суслова Т.Е., Кологривова И.В., Кошельская О.А., Винницкая И.В.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
по новой медицинской технологии**

**«Способ оценки инсулин-опосредованной регуляции  
функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных сердечно-  
сосудистыми заболеваниями с сочетанием сахарного диабета 2-го  
типа»**

Томск 2017

# 1. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

## 1.1 Аннотация

Настоящая медицинская технология «Способ оценки инсулин-опосредованной регуляции функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями с сочетанием сахарного диабета 2-го типа» разработана для персонифицированной оценки особенностей функционирования провоспалительных Т-лимфоцитов-хелперов 17-го типа у пациентов с нарушениями углеводного обмена.

Технология является уникальной для Российской Федерации, поскольку в настоящее время при ведении пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в диагностические алгоритмы не входит оценка влияния инсулина на иммунорегуляторные параметры.

Сутью технологии является выделение мононуклеарных клеток периферической крови, культивирование их в среде с физиологической и повышенной концентрацией инсулина с последующей оценкой функциональной активности Th17-лимфоцитов. В качестве маркеров повышенной функциональной активности будут определяться процент Th17-лимфоцитов, отличающихся внутриклеточной продукцией IL-17. Для оценки исходной активации Th17-лимфоцитов исследуемые параметры будут также оцениваться в среде культивирования, не содержащей инсулин.

Использование технологии показано пациентам с нарушениями углеводного обмена.

Масштаб новизны технологии (1 - новая отраслевая технология в мире (открытия, изобретения), **2 - новая технология для отрасли в стране**, 3 - новая технология для учреждения-исполнителя)

Уровень новизны технологии (1 - радикальная, **2 - улучшающая**)

Метод оказания медицинской помощи (1 - инвазивный, **2 - неинвазивный**)

## Информация о внедрении медицинской технологии

Информация о внедрении медицинской технологии	Внедрена в лечебно-диагностический процесс клиники НИИ кардиологии Томского НИМЦ (акт внедрения № 8 от 12.10.2017)
---	--

## 1.2 Введение

Устойчивость клеток и тканей к влиянию инсулина (инсулинорезистентность) лежит в основе развития сахарного диабета (СД) 2-го типа, ведущим осложнением которого являются сердечно-сосудистые заболевания, включая инфаркты и инсульты. Доказано, что развитие воспаления тесно взаимосвязано с развитием инсулинорезистентности: активация воспалительных сигнальных путей и продукция провоспалительных цитокинов ассоциируются со снижением чувствительности метаболически активных тканей (скелетной ткани, белой жировой ткани, печени) к инсулину.

В большинстве случаев резистентность к действию инсулина возникает на клеточном уровне после связывания инсулина с его рецептором. Дефекты могут возникать на различных этапах передачи сигнала инсулина и включают нарушения

фосфорилирования тирозина инсулинового рецептора, субстратов инсулинового рецептора, фосфатидилинозитол-3 киназы, аномалии функционирования белка-транспортера глюкозы ГЛЮТ 4. В то же время известно, что инсулин обладает плейотропными эффектами, и помимо влияния на метаболизм углеводов, жиров и белков оказывает регуляторное влияние на клеточную пролиферацию и иммунный ответ. Инсулин поддерживает активированное состояние Т-клеток и усиливает действие регуляторных, ростовых и дифференцировочных факторов. Было показано, что ответ стимулированных Т-лимфоцитов на инсулин может в некоторой степени отражать состояние углеводного обмена в организме хозяина. СД 2-го типа характеризуется активацией Т-лимфоцитов-хелперов 17-го типа, что увеличивает риск развития осложнений в данной группе пациентов. Стандартным подходом к изучению содержания и функциональной активности Th17-лимфоцитов является стимуляция моноклеарной фракции клеток крови фобол 12-мирилат 13-ацетатом (ФМА) в сочетании с иономицином и оценка количества IL-17+ Th17-лимфоцитов. При этом происходит активация классических ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma$ ) и новых изоформ ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) протеинкиназы С (PKC). Показано, что инсулин также приводит к активации PKC и при СД 2-го типа функционирование различных изоформ PKC изменяется. Учитывая, что нарушение чувствительности к инсулину тесно взаимосвязано с развитием системного воспаления, важным представляется оценить эффекты инсулина на функциональную активность Th17-лимфоцитов.

Все вышеперечисленное и послужило поводом для разработки данной медицинской технологии.

### **1.3 Область применения**

Медицинская технология разработана для персонифицированной оценки воспаления у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и нарушениями обмена углеводов в зависимости от чувствительности клеток крови к инсулину

### **1.4 Нормативные ссылки**

В настоящем документе использованы ссылки на нормативные документы:

- Правила подготовки нормативных правовых актов федеральных органов исполнительной власти и их государственной регистрации (в ред. Постановлений Правительства РФ от 13.08.1997 г. № 1009, с изменениями от 11.12.1997 г. № 1538, 06.11.1998 г. № 1304, от 11.02.1999 г. № 154, от 30.09.2002 г. № 715, от 07.07.2006 г. № 418, от 29.12.2008 г. № 1048, от 17.03.2009 г. № 242, от 20.02.2010 г. № 336).
- Постановление Правительства Российской Федерации от 15 июня 2009 г. № 477 «Об утверждении Правил делопроизводства в федеральных органах исполнительной власти».
- ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения».
- ГОСТ Р 1.5-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты национальные Российской Федерации. Правила построения, изложения, оформления и обозначения».
- ГОСТ Р 1.1.003-96 «Общие требования к построению, изложению и оформлению нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования. Руководство».

- ГОСТ Р 8.563-96 «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Порядок разработки государственных стандартов».
- ГОСТ Р 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».

### 1.5 Определения, обозначения, сокращения, ключевые слова

IL-17	интерлейкин 17
PBS	фосфатно-солевой буферный раствор
PKC	протеинкиназа C
Th17	T-лимфоциты-хелперы 17-го типа
ФМА	форбол 12-миристат 13-ацетат

### 1.6 Показания и противопоказания к использованию метода

#### 1.6.1 Показания:

- Установленный по результатам расширенного клинико-инструментального обследования диагноз СД 2-го типа.
- Нарушения содержания глюкозы натощак или нарушения толерантности к углеводам.

#### 1.6.2 Противопоказания

Абсолютные противопоказания:

- Аутоиммунные заболевания у пациента и близких родственников пациента в анамнезе.
- Обострение воспалительных заболеваний за месяц или на момент обследования.
- Иммуномодулирующая терапия.

Относительные противопоказания:

- Острые сосудистые осложнения (инсульт, транзиторная ишемическая атака, инфаркт миокарда) менее чем за 1 год до включения в исследование.
- Нестабильная стенокардия, нарушения ритма сердца, требующие антиаритмической терапии или оперативного вмешательства, ХСН выше 2 ФК (NYHA).
- Выраженный периферический атеросклероз.

### 1.7 Методика проведения медицинской технологии «Способ оценки инсулин-опосредованной регуляции функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями с сочетанием сахарного диабета 2-го типа»

#### 1.7.1 Последовательность осуществления медицинской технологии

Утром натощак у пациентов производится взятие периферической венозной крови в пробирки-вакутейнеры с гепарином.

Для получения мононуклеаров крови венозную кровь с гепарином разводят в соотношении 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и центрифугируют на градиенте плотности при ускорении 400g в течение 20 мин. Полученное кольцо мононуклеарных клеток переносят в другую пробирку и отмывают центрифугированием в PBS с фетальной бычьей сывороткой при ускорении 400 g

двукратно в течение 10 мин. Клетки ресуспендируют в 1 мл PBS. Подсчет клеток проводят в камере Горяева под микроскопом ЛОМО (Биолам, Россия). Концентрацию клеток доводят средой RPMI 1640 до  $1 \times 10^6$  клеток на мл.

Мононуклеарные лейкоциты в количестве  $10^6$  клеток культивируют в 3 пробирках емкостью 15 мл в течение 24 ч при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина. В культуральную среду 2 пробирок добавляют инсулин в конечных концентрациях  $10^{-10}$  М и  $10^{-8}$  М соответственно. В одной из пробирок культуру мононуклеарных лейкоцитов оставляют интактной. Через 24 ч супернатанты клеточных культур удаляют, а клетки ресуспендируют в фосфатно-солевом буферном растворе. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивают 7-актиноаминомицином D (7-AAD). Жизнеспособность клеток должна составлять от 95% до 98%.

В полученных прекондиционированных инсулином и интактных мононуклеарных лейкоцитах определяют долю IL17+ Th17-лимфоцитов. Для этого мононуклеарные клетки культивируют в течение 6 ч на среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина, при 37 °С и концентрации CO<sub>2</sub> 5%. Через 2 ч после начала культивирования в среду добавляют GolgiPlug (активное вещество - брефельдин А) в концентрации, рекомендованной производителем, для ингибирования секреции цитокинов. Часть фракции мононуклеаров стимулируют форбол 12-мириостат 13-ацетатом (ФМА) в концентрации 50 нг/мл и иономицином (1 мкг/мл). Часть фракции мононуклеаров периферической крови оставляют нестимулированной для оценки исходного уровня активации Th17-лимфоцитов.

После культивирования по 100 мкл клеточной суспензии каждого образца переносят в полистирольную пробирку 12x75 мм для проточной цитометрии. Для определения фенотипа клеток используют моноклональные фикоэритрин карбоксициан-5 (PECy5)-меченные анти-CD4 антитела. Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксируют 1% параформальдегидом (CellFIX). Добавляют FACS-пермеабилитизирующий раствор в соответствии с рекомендациями производителя для моноклональных антител. Затем клетки инкубируют с PE-мечеными анти-IL-17 антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. После окрашивания клетки отмывают однократно и фиксируют 1% параформальдегидом. В качестве контрольного образца используют неокрашенные мононуклеары крови.

Пробы анализируют на проточном цитометре (FACSCalibur; Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro, BD, США). При сборе данных учитывают от 50000 до 200000 событий. Результаты выражают в проценте IL-17+ клеток от CD4+-лимфоцитов.

В норме прекондиционирование мононуклеарных лейкоцитов инсулином приводит к увеличению количества IL-17+ лимфоцитов в интактной и ФМА-стимулированной культуре клеток. При нарушениях углеводного обмена, ассоциированных с наличием хронического субклинического воспаления, регистрируется исходно повышенное содержание IL-17+ Th17-лимфоцитов в клеточной культуре без инсулина (более 0,8% в культуре клеток после стимуляции ФМА с иономицином) и отсутствие увеличения содержания IL-17+ Th17-лимфоцитов в прекондиционированных инсулином культурах мононуклеарных лейкоцитов, стимулированных ФМА в сочетании с иономицином (увеличение содержания IL-17+

Th17-лимфоцитов менее чем на 0,17% при прекондиционировании инсулином в концентрации  $10^{-10}$  М; менее чем на 0,12% при прекондиционировании инсулином в концентрации  $10^{-8}$  М по сравнению с условиями культивирования без инсулина соответственно).

1.7.2 Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии предполагает использование следующего оборудования и расходного материала:

Оборудование:

1. Проточный цитометр FACS CALIBUR (Becton Dickinson, США).
2. Бокс с ламинарным вертикальным потоком воздуха «САМПО», модель ВЛ-12 (Санкт-Петербург, Россия).
3. Центрифуга Heraeus Labofuge 400 (Thermo ELECTRON CORPORATION, США).
4. CO<sub>2</sub>-инкубатор CB150 (BINDER, Германия).
5. Микроскоп ЛОМО (Биолам, Россия).
6. Автоматические дозаторы 5 мл, 1 мл, 50-200 мкл, 1-10 мкл.

Расходный материал:

1. Градиент плотности Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, США).
2. Фосфатно-солевой буферный раствор в таблетках (Sigma Aldrich, США).
3. Среда RPMI 1640 с глутамином (Sigma Aldrich, США).
4. Фетальная бычья сыворотка (Sigma Aldrich, США).
5. Пенициллин-стрептомицин (Sigma Aldrich, США).
6. Инсулин человеческий (Sigma Aldrich, США).
7. 7-актиноаминомицин D (Becton Dickinson, США).
8. GolgiPlug (BD Pharmingen, США).
9. Форбол 12-миристанат 13-ацетат (Sigma Aldrich, США).
10. Иономицин (Sigma Aldrich, США).
11. PE-Cy5-меченные анти-CD4 моноклональные антитела (Becton Dickinson, США).
12. PE-меченные моноклональные анти-IL-17 антитела (R&D, США).
13. 1% парафармальдегид CellFIX (BD Biosciences, США).
14. FACS-пермеабилзирующий раствор (BD Biosciences, США).
15. Конические пробирки для центрифугирования.
16. Круглодонные пробирки.
17. Полистирольные пробирки 12x75 мм.
18. Сменные наконечники для дозаторов объемом 5 мл, 1 мл, 200 мкл.

## 1.8 Осложнения и способы их устранения

Единственной возможной категорией осложнений являются осложнения, связанные с венопункцией.

К местным осложнениям венопункции относятся:

- Подкожная гематома - кровоизлияние в мягкие ткани в месте венопункции.
- Флебит - воспаление вены в месте венопункции (признаки: боль, уплотнение, гиперемия по ходу вены).
- Повреждение нерва в результате его укола или сдавления вследствие образования гематомы.
- Воспалительные явления мягких тканей в месте венопункции - инфильтрат, абсцесс, некроз кожи.

К общим осложнениям венопункции относится септицемия, являющаяся потенциально опасным осложнением для жизни пациента.

Количество и тяжесть осложнений могут быть снижены за счет:

- Хорошей техники венопункции.
- Правильного выбора места венопункции.
- Соблюдения правил асептики и антисептики.
- Применения давящих повязок на месте венопункции.
- Использования другой руки при повторной попытке провести венопункцию (повторное наложение жгута на ту же руку может привести к увеличению гематомы).

## 1.9 Заключение

Проведение медицинской технологии «Способ оценки инсулин-опосредованной регуляции функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями с сочетанием сахарного диабета 2-го типа» позволяет выявить наличие иммунологически-опосредованного хронического субклинического воспаления у пациентов с нарушениями углеводного обмена и зависимость активности воспаления от чувствительности клеток крови к инсулину.

## 1.10 Библиография

Библиографические данные методических рекомендаций по применению новой медицинской технологии, научных публикаций, связанных с разработкой данной медицинской технологии (при наличии)	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Kologrivova I.V., Suslova T. E., Koshelskaya O. A., Vinnizkaya I.V., Popov S.V. T-helper-1, T-helper-17, T-regulatory lymphocytes in hypertensive patients with diabetes mellitus type 2 or impaired glucose tolerance: association with clinical and metabolic parameters in a case control study // Translational Medicine Communications . - 2016. - Vol. 1, No. 2. – P. 11.</li><li>2. Кологривова И. В., Сулова Т. Е., Кошельская О. А., Винницкая И. В. Т-хелперы-1 и Т-хелперы-17 у пациентов с сочетанием сахарного диабета 2-го типа и ишемической болезни сердца // Российский иммунологический журнал. - 2016. - Т. 10(19), № 2(1). - С. 287-289.</li></ol>
--	---

## 2. ТРЕБОВАНИЯ К МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ, В КОТОРОЙ БУДЕТ ОСУЩЕСТВЛЯТЬСЯ ВНЕДРЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Наличие лицензии на осуществление медицинской деятельности с указанием перечня работ (услуг), составляющих медицинскую деятельность, для оказания первичной специализированной медико-санитарной помощи; специализированной медицинской помощи; высокотехнологичной медицинской помощи в стационарных условиях и в условиях дневного стационара. Должна включать в себя профилактику, диагностику и лечение заболеваний и состояний, требующих использования функциональных методов исследования, а также медицинскую реабилитацию по профилю «кардиология» и «терапия».

### **3. ТРЕБОВАНИЕ К КАДРОВОМУ СОСТАВУ**

Медицинская технология предназначена для врачей-кардиологов и врачей клинической лабораторной диагностики медицинских учреждений кардиологического, эндокринологического и терапевтического профиля.

### **4. ТРЕБОВАНИЯ К ОСНАЩЕНИЮ И ИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ УСПЕШНОГО ВНЕДРЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ЗА ПРЕДЕЛАМИ ОРГАНИЗАЦИИ-РАЗРАБОТЧИКА ТЕХНОЛОГИИ**

Необходимо наличие ламинарного шкафа I класса защиты, CO<sub>2</sub>-инкубатора и проточного цитометра.