

Саприна Татьяна Владимировна

**ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ОСОБЕННОСТИ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭНДОКРИННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
АУТОИММУННОГО ГЕНЕЗА**

**14.03.03 – патологическая физиология
14.01.02 – эндокринология**

**Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Томск – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,
профессор
доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

Ворожцова Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
заведующий лабораторией иммунофармакологии
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии и регенеративной медицины имени
Е.Д. Гольдберга» ФАНО

Шерстобоев Евгений Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор
руководитель лаборатории клеточно-
молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ
«НИИ медицинских проблем Севера»

Савченко Андрей Анатольевич

доктор медицинских наук
профессор кафедры госпитальной терапии ФГОУ
ВПО «Нижегородская государственная
медицинская академия» Минздрава России

Занозина Ольга Владимировна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «25» декабря 2014 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан «___» октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение механизмов формирования и развития аутоиммунных заболеваний эндокринной системы на протяжении долгого времени не теряет своей актуальности, что связано с прогрессирующим ростом числа пациентов с эндокринопатиями аутоиммунного генеза (Балаболкин, М.И., 2008; Кандрор В.И., 2008). Такие заболевания как аутоиммунный сахарный диабет и аутоиммунные тиреопатии характеризуются многочисленностью органов и систем, вовлекаемых в патологический процесс при нарушении функций эндокринных желез, что существенно ухудшает качество жизни пациентов (Сарвилина И.В. и соавт., 2007; Заводник И.Б. и соавт., 2011). Кроме того, актуальность изучения проблемы аутоиммунных эндокринопатий обусловлена потребностью в получении новых данных о механизмах формирования и прогрессирования различных форм аутореактивных повреждений эндокринных желез с целью совершенствования методов диагностики, прогноза течения заболеваний, а также подходов терапевтического воздействия.

Согласно современным представлениям, первичные механизмы развития аутоиммунных эндокринопатий опосредованы дизрегуляцией в системе иммунитета путем срыва толерантности организма к собственным клеткам и тканям (Никонова, Т.В., 2006; Кандрор В.И., 2008; Akesson C. et al., 2010; Ланин Д.В. и соавт., 2011). При этом проявляются общие звенья патогенеза, характерные как для аутоиммунных вариантов сахарного диабета (сахарного диабета 1 типа (СД1), латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA)), так и для аутоиммунных тиреопатий (аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и болезни Грейвса (БГ)). Так, данные заболевания сопровождаются продукцией органоспецифических аутоантител, инфильтрацией железы различными субпопуляциями лимфоцитов и продукцией ими широкого спектра цитокинов, в частности, TNF- α , IL-2, IL-4 (Кандрор В.И., 2006, 2008; Pugliese A., 2010; Maruyama T. et al., 2011; Capra M. et al., 2011).

Как уже было отмечено, аутоиммунный сахарный диабет является гетерогенным заболеванием. Отличительной чертой являются темпы деструкции β -клеток поджелудочной железы и развитие инсулиновой недостаточности, которые при LADA наступают значительно позже, чем при СД1 (Seissler J., 2008; Korf H. et al., 2010). Аналогичная разница в функциональном состоянии железы характерна для аутоиммунных тиреопатий. Ведь, как известно, АИТ ассоциирован с потерей функции щитовидной железы и снижением в крови уровня тиреоидных гормонов, а БГ, напротив, характеризуется гиперфункцией щитовидной железы и развитием тиреотоксикоза (Фадеев В.В., Мельниченко Г.А., 2005; Capra M. et al., 2011). Подобные различия клинических проявлений рассматриваемых заболеваний свидетельствуют о реализации специфических для каждой нозологии механизмов аутореактивных процессов.

Степень разработанности темы. Считается, что аутоиммунное воспаление, лежащее в основе АИТ и СД1, развивается преимущественно по Th1 типу иммунного ответа с преобладанием продукции цитокинов Th1 профиля, которые стимулируют цитотоксическое воздействие иммуноцитов на гормон-продуцирующие клетки желез и, в последующем, развитие гипofункции эндокринной железы (Кандрор В.И., 2008; Dardalhon V., 2008; Poncin S. et al., 2008). Тогда как, для LADA и БГ свойственно преобладание в патогенезе роли Th2

иммунного ответа, способствующего развитию гиперфункции щитовидной железы в случае БГ и длительную сохранность продукции инсулина при LADA (Кандроп В.И., 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2010).

Особая роль в поляризации иммунного ответа, индукции и поддержании аутоиммунного воспаления при указанных заболеваниях отводится цитокинам. Кроме иммуномодулирующего эффекта, цитокины способны регулировать миграцию и секрецию цитотоксических соединений аутореактивными иммунными клетками, процессы пролиферации и апоптоза иммуноцитов и клеток эндокринных желез, а, следовательно, влиять на функциональную активность гормон-продуцирующих клеток и клиническое течение заболеваний (Weetman A.P., 2004; Дедов И.И. и соавт., 2005; Fang Y. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Stojanovic J., 2009). Поэтому поддержание воспаления в органе-мишени либо его разрешение зависит от баланса продукции цитокинов с про- и противовоспалительными функциями, таких как TNF- α , IL-2, IL-4, и способности клеток к их рецепции.

Но, как показывает клиническая практика, в щитовидной железе могут сочетаться процессы, характерные для АИТ и БГ одновременно, что ведет к спонтанной ремиссии БГ. А при LADA в определенный период наступает резкое снижение инсулин-продуцирующей функции поджелудочной железы и развиваются более тяжелые по течению, в сравнении с СД1, ангиопатии. В последние годы активно ведутся исследования молекулярных механизмов дисрегуляции иммунной системы при аутоиммунных заболеваниях поджелудочной и щитовидной желез (Rabinovitch A., 2003; Atkinson M.A., 2005; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Fang Y. et al., 2008; Culina S., Mallone R., 2011). На современном этапе изучения данной проблемы становится очевидным, что модель, указывающая на строгую поляризацию иммунного ответа по Th1 пути при СД1 и АИТ, а также по Th2 пути при LADA и БГ, требует существенного дополнения и расширения.

Таким образом, пониманию патогенеза и причин различного клинического течения отдельных вариантов эндокринопатий аутоиммунного генеза могут способствовать исследования, направленные на изучение состояния системы иммунорегуляторных и эффекторных цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ) и субпопуляционного состава лимфоцитов крови.

Цель исследования: установить общие закономерности и особенности цитокиноопосредованных механизмов дисрегуляции иммунной системы и их роль в детерминации гормонально-метаболических изменений при эндокринопатиях аутоиммунного генеза.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями (сахарный диабет 1 типа, латентный аутоиммунный диабет взрослых, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) с учетом клинического варианта и длительности заболевания, характерных для каждой нозологии гормонально-метаболических изменений.
2. Оценить концентрации иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α), содержание sTNF-RI и sFasL в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, а также количество IL-2R-, IL-4R-, IL-10R-, TNF-RI-,

Fas-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета в зависимости от стажа заболевания, метаболических особенностей заболевания, наличия микрососудистых осложнений.

3. Дать комплексную характеристику состояния цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- α) и их рецепторов (IL-2R, IL-4R, TNF-RI, sTNF-RI) у больных аутоиммунными тиреопатиями с учетом нозологического варианта (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) и функционального состояния щитовидной железы.

4. Оценить экспрессию рецепторов цитокинов (IL-2R, IL-4R, TNF-RI) в образцах ткани щитовидной железы у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.

5. Выявить общие закономерности и особенности иммунных нарушений у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями с учетом клинического фенотипа заболеваний: стажа заболевания, метаболических особенностей и наличия микрососудистых осложнений при сахарном диабете; морфофункциональными изменениями щитовидной железы, титром и спектром органо-специфических аутоантител при аутоиммунных тиреопатиях.

6. Разработать прогностические модели для выделения латентного аутоиммунного сахарного диабета среди пациентов с гормонально-метаболическим фенотипом сахарного диабета типа 2, а также аутоиммунных тиреопатий, основанные на оценке изменений субпопуляционного состава лимфоцитов, цитокин-секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов и количестве лимфоцитов, несущих комплементарные рецепторы.

Научная новизна. Впервые в сравнительном аспекте представлены новые знания фундаментального характера о роли иммунорегуляторных и эффекторных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α), а также цитокинопосредованных механизмах дисрегуляции иммунной системы при различных клинических вариантах аутоиммунного сахарного диабета и тиреопатий с учетом длительности заболевания, наличия микрососудистых осложнений при сахарном диабете и характерных для каждой нозологии гормонально-метаболических изменений.

Впервые показано, что патогенез латентного аутоиммунного сахарного диабета взрослых, по сравнению с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения, сопряжен с дисбалансом цитокинов Th1/Th2-профиля (повышение секреции IL-4 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*, увеличение количества IL-4R-лимфоцитов), активацией системы «Fas-FasL-sFasL», а также различиями в системе «лиганд-рецептор» TNF- α .

Впервые установлено, что патогенез диабетических микроангиопатий у пациентов с латентным аутоиммунным сахарным диабетом взрослых сопряжен с сочетанием метаболических (снижение базальной секреции С-пептида после 4-го года заболевания) и иммунологических изменений (повышение концентраций IL-2, IL-4, TNF- α и количества лимфоцитов, несущих комплементарные им рецепторы), что определяет раннее развитие микроангиопатий при данном варианте сахарного диабета по сравнению с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения.

Впервые показано, что развитие аутоиммунных тиреопатий сопровождается рядом однонаправленных изменений в иммунной системе: дисбалансом систем цитокинов IL-4 (увеличением количества CD124+-лимфоцитов при отсутствии изменений секреции IL-4 *in vitro*) и TNF- α (снижением концентраций TNF- α и

sTNF-RI в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, а также уменьшением количества CD120⁺-лимфоцитов). Показано, что при болезни Грейвса, независимо от функционального состояния щитовидной железы, уменьшается количество CD25⁺-экспрессирующих лимфоцитов.

Впервые показано, что IL-2-секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* сопряжена с изменением концентраций тиреоидных гормонов в сыворотке крови и не имеет различий между аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса в фазе эутиреоза; при сахарном диабете – с выраженностью гипергликемии (повышается при декомпенсации углеводного обмена).

С привлечением иммуногистохимического метода исследования впервые проведен анализ сопряженности клинических особенностей болезни Грейвса с особенностями экспрессии рецепторов цитокинов (TNF-RI, IL-2R, IL-4R) как фолликулярным эпителием щитовидной железы, так и инфильтрирующими ткань щитовидной железы клетками лимфоплазмочитарной и моноцитарно-макрофагальной морфологии. Установлены морфологические предикторы для различных клинических фенотипов течения болезни Грейвса.

Впервые установлено, что экспрессия TNF-RI инфильтрирующими ткань щитовидной железы мононуклеарными лейкоцитами при аутоиммунных тиреопатиях сопряжена с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия, что связывает эффекты TNF- α и структурно-функциональные изменения в щитовидной железе при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса.

На основе проведенных исследований впервые предложены подходы и критерии для клинико-лабораторной дифференциальной диагностики различных вариантов аутоиммунных эндокринопатий.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови и состояния системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF- α раскрывают цитокиноопосредованные механизмы дисрегуляции иммунной системы при аутоиммунном СД и аутоиммунных тиреопатиях. Установлен комплекс ключевых иммунологических показателей, вовлеченных в патогенез аутоиммунных эндокринопатий и формирование клинических особенностей (темпы развития инсулинопотребности при аутоиммунном сахарном диабете, особенности формирования диабетических микроангиопатий, развитие дистиреоза при АИТП и активности аутоиммунного процесса в ткани ЩЖ, эффективности консервативной терапии при болезни Грейвса). На основе полученных данных определены потенциальные мишени для иммуотропной терапии аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий.

Методология и методы исследования. Дизайн исследования – открытое, когортное, контролируемое, диагностическое (поперечное) исследование.

Методы исследования: клинический блок, иммунологический блок (детекция ауто-антител к антигенам щитовидной железы и β -клеток поджелудочной железы, определение субпопуляционного состава лимфоцитов, культуральные методы исследования, исследование секреции иммунорегуляторных цитокинов *in vitro*, определение количества лимфоцитов, несущих рецепторы цитокинов), морфологический анализ (гистологический, иммуногистохимический методы

исследования), статистическая обработка биомедицинских данных (описательная статистика, корреляционный анализ, сравнение количественных и качественных признаков в 2 и более группах, дискриминантный анализ).

Положения, выносимые на защиту:

1. Наряду с общими изменениями параметров иммунной системы, являющимися типовыми для заболеваний аутоиммунного генеза (аутоиммунный сахарный диабет, аутоиммунные тиреопатии), имеют место характерные для каждой нозологии нарушения цитокин-опосредованных механизмов индукции и поддержания аутоиммунного процесса. Установленные особенности дисбаланса иммунной системы сопряжены с клиническими и гормонально-метаболическими проявлениями аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий.
2. Пациентов с латентным сахарным диабетом взрослых от сахарного диабета 1 типа манифестного течения отличает комплекс клинических, гормонально-метаболических и иммунологических изменений. Иммунопатогенез латентного аутоиммунного сахарного диабета сопряжен с дисбалансом цитокинов Th1/Th2-профиля (повышение секреции IL-4 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами, увеличение количества IL-4R-лимфоцитов), активацией системы «Fas-FasL-sFasL», а также различиями в системе «лиганд-рецептор» TNF- α . В основе раннего развития диабетических микроангиопатий при латентном сахарном диабете лежит сочетание метаболических (снижения базальной концентрации С-пептида после 4-го года заболевания) и иммунологических изменений (повышение IL-2-, IL-4-, TNF α - секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов и увеличение количества лимфоцитов, презентующих комплементарные им рецепторы), формируя эффект «иммуно-метаболического усиления».
3. Развитие аутоиммунных тиреопатий ассоциировано с общими и специфическими для каждой нозологии (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов, а также дисбалансом системы цитокинов (увеличение количества CD124+-лимфоцитов при отсутствии изменений продукции IL-4, угнетение компонентов системы «лиганд-рецептор» TNF- α). Экспрессия рецепторов цитокинов (TNF-RI, IL-2R, IL-4R) в ткани щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса не имеет принципиальных различий. При анализе клинических, гормональных иммунологических параметров в соответствии с гистологическими вариантами перестройки паренхимы при болезни Грейвса установлены предикторы клинической гетерогенности течения данного заболевания.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы, представленные в диссертации, основаны на обследовании 239 пациентов (аутоиммунный сахарный диабет, аутоиммунные тиреопатии, контрольная группа), представленная выборка репрезентативна для оценки всех изучаемых вариантов патологии. Оборудование, на котором выполнялись исследования, проходило регулярную поверку в соответствии с «ГОСТ Р 8.563-96 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения

измерений» с вынесением соответствующего заключения метрологической службы, что подтверждается наличием сертификатов. Используются современные методические подходы для оценки иммунологических параметров, а также проведена грамотная статистическая обработка биометрических данных.

Результаты проведенных исследований доложены и обсуждены на научной конференции «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2009), конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2010, 2011), межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2010), XI конгрессе молодых ученых и специалистов (Томск, 2010), международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в медицине и физиологии» (Санкт-Петербург, 2010), межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы эндокринологии» (Томск, 2010, 2011, 2012, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), II международном научном конгрессе «Будущее в развитии науки и техники» (Польша, Пшемьсль, 2011), V Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2010), II Съезде терапевтов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010), Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва, 2012), VI Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2013), на заседаниях общества эндокринологов (Томск, 2009-2014).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в лекциях по патологической физиологии (разделы «Патофизиология иммунной системы», «Патофизиология эндокринной системы», «Патофизиология клетки») для студентов 2-3 курсов лечебного и педиатрического факультетов, в лекциях по эндокринологии, диабетологии на 5-6 курсах лечебного и педиатрического факультетов, внедрены в учебный процесс кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики в разделы дисциплин «Молекулярные основы патологии», «Современные проблемы медико-биологической науки» для студентов медико-биологического факультета Сибирского государственного медицинского университета.

Исследования поддержаны ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт № 02.740.11.0311), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012» (государственный контракт № 16.512.11.2087), Грантом президента для поддержки молодых российских ученых (государственный контракт № МД-1233.2012.7), Грантом президента для поддержки ведущих научных школ (государственный контракт № НШ-614.2012.7).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 34 работы, из них – 16 статей в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 388 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы (глава 1), материала и методов исследования (глава 2), результатов

исследований и их обсуждения (главы 3-5), заключения, выводов и списка литературы, приложений (3). Работа иллюстрирована 60 таблицами и 44 рисунками, список цитированной литературы включает 801 источника, из них – 98 отечественных, 703 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе приведены результаты комплексного обследования 209 пациентов (96 мужчин и 113 женщин) в возрасте от 18 до 55 лет. Обследованные пациенты находились либо на диспансерном учете, либо на стационарном лечении в клинике эндокринологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (главный врач – канд. мед. наук В.М. Шевелев).

В исследовании были выделены четыре основные клинические группы: больные СД1 (n=37); больные LADA (n=31); пациенты с АИТ (n=29); пациенты с болезнью Грейвса (n=45). Группу сравнения для больных с сахарным диабетом аутоиммунного генеза составили пациенты с СД2 (n=67). Критериями включения пациентов в исследование явились: четко верифицированный диагноз, возраст больных 18-55 лет на момент скрининга, согласие пациента участвовать в исследовании и способность дать письменное информированное согласие.

Критериями исключения пациентов из программы исследования являлись: беременность женщин или факт кормления грудью в период проведения обследования, наличие на момент скрининга и обследования острых форм и обострения хронических форм инфекционных заболеваний, наличие гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (атопическая болезнь – бронхиальная астма, атопический дерматит и тд.), диагностированное и/или леченное злокачественное заболевание в течение последних 5 лет, системные воспалительные заболевания (коллагенозы), нефрит любой этиологии, псориаз, инфицированность вирусами гепатитов В, С, D, ВИЧ, донорство одной (500 мл) или более единиц крови, значительная потеря крови в течение последних 2 недель, переливание крови в течение последних 8 недель; длительное пероральное или парентеральное применение кортикостероидов (>7 дней лечения подряд) в течение 4 недель до скрининга, активное злоупотребление психоактивными веществами в анамнезе (включая алкоголь), установленная гемоглобинопатия или хроническая анемия, применение экспериментальных препаратов в течение 30 дней или 5 периодов полувыведения до скрининга, а также отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие). Исследование соответствовало требованиям Локального Этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 946, дата проведения заседания – 16 февраля 2009 г.).

В контрольную группу были включены 30 практически здоровых добровольцев (14 мужчин и 16 женщин, средний возраст – $45,3 \pm 5,6$ лет), с ИМТ от 18 до 27 кг/м², с верифицированным отсутствием нарушений углеводного обмена и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, с отсутствием аутоантител к структурам инсулярного аппарата поджелудочной железы и фолликулярного эпителия щитовидной железы, с учетом аналогичных критериев исключения из программы исследования.

Диагноз СД и его осложнений устанавливали после детального клинико-инструментального обследования пациентов на базе эндокринологической клиники ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России на основании критериев классификации СД, принятой ВОЗ (1999), «Национальных стандартов оказания помощи больным сахарным диабетом», утвержденных Министерством здравоохранения РФ, а также согласно Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятой Всемирной организацией здравоохранения в Женеве в 1995 году (по МКБ-10 рубрики E10, E11 и E13).

В группу пациентов с СД1 манифестного течения были включены 24 мужчины и 13 женщин (средний возраст $30,5 \pm 1,2$ г). Диагноз СД1 (шифр МКБ – E.10) устанавливался на основании развития кетоацидоза в течение первых 6 месяцев от начала заболевания, персистирующей потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза для достижения стабильной метаболической компенсации. Группу сравнения составили пациенты с LADA (12 мужчин и 19 женщин, средний возраст $41,4 \pm 2,1$ г). Данная группа была сформирована путем скринингового обследования пациентов с первичным диагнозом сахарный диабет 2 типа. Диагноз LADA устанавливался на основании клинических критериев: острой манифестации заболевания в возрасте от 30 до 50 лет без развития кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес от начала заболевания, индекс массы тела (ИМТ) менее 25 кг/м^2 , отсутствие признаков метаболического синдрома, появление клинических признаков вторичной резистентности к препаратам сульфонилмочевины в течение первых 3-5 лет терапии, наличие аутоиммунных заболеваний у пациента или его родственников первой линии. Верификация диагноза проведена серологически по наличию одного или нескольких типов аутоантител к структурам островков Лангерганса поджелудочной железы (уровень аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты $>1,050 \text{ Ед/мл}$, к инсулину $>10 \text{ Ед/мл}$, наличие антител к клеткам островков Лангерганса при качественном определении).

Группой сравнения для обследованных пациентов с СД1 и LADA послужили 67 человек с диагнозом СД типа 2, прошедшие первоначальный клинический и лабораторный скрининг (40 женщин и 27 мужчин, средний возраст – $46,8 \pm 1,1$ г). Диагноз СД типа 2 устанавливался на основании наличия маркеров метаболического синдрома, постепенного начала заболевания без развития кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес от начала заболевания.

Каждая группа пациентов с сахарным диабетом была разделена на подгруппы в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет), наличия микрососудистых осложнений (диабетической ретинопатии, нефропатии). Подобное разделение пациентов по стажу заболевания связано с одной стороны необходимостью исключить из программы исследования пациентов с макрососудистыми осложнениями, появление которых отмечалось поле 10-го года

заболевания, а с другой – выявленными в ходе исследования гормонально-метаболическими закономерностями течения СД1, LADA и СД2.

Для решения поставленных в работе задач нами была сформирована выборка из 74 человек (из них 33 мужчины и 41 женщина, средний возраст $42,2 \pm 1,4$ года) с тиреопатиями аутоиммунного генеза. Основная группа была разделена впоследствии на подгруппы в зависимости от нозологической формы и функционального состояния щитовидной железы. В первую группу были включены 29 пациентов (12 мужчин, 17 женщин, средний возраст – $44,9 \pm 1,2$ года) с АИТ, вторую группу составили 45 пациентов (21 мужчин, 24 женщины, средний возраст – $42,9 \pm 1,5$ года) с БГ. Группа больных АИТ в зависимости от функционального состояния ЩЖ была разделена на подгруппы пациентов в фазе эутиреоза (19 пациентов, из них 9 мужчины, 10 женщин, средний возраст $42,3 \pm 1,3$ года) и в фазе гипотиреоза (10 пациентов, из них 3 мужчины, 7 женщин, средний возраст $44,7 \pm 1,6$ года). Подобным образом в группе пациентов с БГ были выделены 2 подгруппы: пациенты в фазе эутиреоза (14 человек, из них 4 мужчины и 10 женщин, средний возраст $38,6 \pm 1,3$ года) и в фазе тиреотоксикоза (31 человек, из них 17 мужчин, 14 женщин, средний возраст $43,8 \pm 1,2$ года). Стаж заболевания у больных АИТ составил $7,5 \pm 5,0$ лет, у больных БГ – $2,6 \pm 1,5$ года. Состояние эутиреоза у пациентов с АИТ достигалось назначением L-тироксина, пациентам с БГ проводилось лечение препаратами тиреостатического ряда (мерказолил, тирозол).

Диагноз АИТ (шифр МКБ – E06.3) и БГ (шифр МКБ – E05.0) устанавливали на основании характерных клинико-лабораторных признаков: данных физикального обследования, наличия характерных ультрасонографических признаков, обнаружения в сыворотке крови у больных повышенного титра анти tireoидных антител (анти-ТПО >30 МЕ/мл и (или) анти-ТГ >30 МЕ/мл), а также при обнаружении вышеуказанных признаков и первичного гипотиреоза (повышенного уровня тиреотропного гормона (ТТГ) ($>3,0$ мМЕ/л) в сочетании с нормальной или пониженной концентрацией свободных фракций трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) (референсные значения для Т3 1,08-3,14 пмоль/л; Т4 12,0-26,0 пмоль/л).

При диагностике БГ обращали внимание на наличие характерных жалоб и клинической картины тиреотоксикоза, данных физикального обследования, обнаружение характерных ультрасонографических признаков, повышенного титра специфических антител (анти-рТТГ $>1,0$ Ед/л) в сыворотке крови, характерных изменений гормонального профиля (низкий уровень ТТГ ($<0,3$ мМЕ/л) в сочетании с повышенной концентрацией свободных фракций Т₃ и Т₄).

Исследование выполнено на базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. Материалом для данных исследований являлась венозная кровь, стабилизированная этилендиаминтетраацетатом, взятая утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 10 мл. В случае определения концентрации аутоантител использовали сыворотку крови, для получения которой венозную кровь набирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания кремнеземом, центрифугировали пробирки 5 мин при 400 g (1500 об/мин).

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови по CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺CD56^{low}-, CD19⁺-маркерам проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител («BD Multitests 6 color TBNK», США). Результаты выражали в процентах и абсолютных значениях. Абсолютное и относительное содержание общего количества лимфоцитов, а также абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов определяли стандартными гематологическими методами (Сисла Б., 2011).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования (Натвиг Дж. и соавт., 1980). Плазму венозной крови наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077\text{г/см}^3$) в соотношении 2:1 и центрифугировали при 400 g (1500 об/мин) в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо мононуклеарных лейкоцитов собирали в стерильную центрифужную пробирку. Дважды отмывали средой RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 400 g (1500 об/мин). Выделенные клетки инкубировали при температуре 37°C без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов (Тотолян А.А. и соавт., 2002). В супернатантах суточных культур мононуклеарных лейкоцитов определяли концентрации цитокинов IL-2, IL-4, TNF- α и растворимого рецептора к TNF- α (sTNF-R1) методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («ВекторБест», Россия; «BenderMedSystems», Австрия).

Регистрацию количества лимфоцитов в крови, несущих рецепторы к IL-2, IL-4 и TNF- α , проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием соответствующих моноклональных антител, меченных фикоэритрином («Beckman Coulter», Франция). Результаты выражали в процентах.

Методом иммуноферментного анализа, в соответствии с инструкциями производителей тест-систем, определяли в сыворотке крови концентрации антител к инсулину («Orgentec», Германия), к поверхностному антигену β -клетки и декарбоксилазе глутаминовой кислоты («Biomerica», США), а также к тиреоидной пероксидазе и к рецептору тиреотропного гормона («DRG», Германия).

Иммуногистохимическое исследование выполнялось на базе НОЦ «Инновационные технологии в морфологии» (заведующая НОЦ – канд. мед. наук, доцент Дзюман А.Н.). Иммуногистохимическое исследование операционного материала щитовидной железы осуществляли по методике Ю.А. Криволапова (Ю.А. Криволапов, Е.Е. Леенман, 2006). Оценка результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для оценки специфичности параллельно ставили реакцию без добавления первичных антител – «отрицательный» контроль.

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. Все количественные показатели проверяли на нормальность распределения с

использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), интерквартильный размах (Q1-Q3). Различия между несколькими группами оценивали по критерию Краскелла-Уоллиса, для попарного анализа количественных признаков в независимых выборках использовали критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. По критерию Вилкоксона проверяли достоверность различий двух сравниваемых групп для зависимых выборочных совокупностей (уровень значимости $p < 0,05$). Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное число и относительную величину в процентах. Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, а также использовался двусторонний вариант точного критерия Фишера с критическим уровнем значимости $p < 0,05$. Для выявления функциональных взаимосвязей между изученными параметрами проводили корреляционный анализ с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Полученную корреляцию считали статистически значимой при $p < 0,05$. Анализ различия времени до наступления исхода проводился методом Каплана-Майера (F-критерий Кокса). Завершенными считали наблюдения, в которых изучаемый исход наступил на момент обследования больного (Реброва О. Ю., 2002). Сравнение многомерных группировок данных проводили с помощью дискриминантного анализа с использованием алгоритма пошагового отбора информативных признаков. Статистическую значимость полученных дискриминантных функций оценивали с помощью λ -критерия Уилкса. Качество дискриминации проверяли по таблице классификации, отображающей результаты отдельных данных в сравниваемых группах на основе дискриминантных функций. Распределение групп по анализируемым признакам проводили с учетом значений координат центроидов на канонических осях (Афифи А., Эйзен С., 1982). При проведении расчетов использовался пакет прикладных программ SPSS 11.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические особенности аутоиммунного сахарного диабета

В 1986 году Groop и соавторы впервые сообщили о подгруппе пациентов с СД 2 типа, у которых, несмотря на присутствие аутоантител к островковой ткани сохранялась собственная секреция инсулина (Groop LC и др., 1986). Данная группа пациентов явно отличалась от классических вариантов сахарного диабета 1 и 2 типа. Позже, (Tuomi и др., 1993) и (Zimmet и соавт., 1994) инициировали распространение эпонима LADA– Latent Autoimmune Diabetes in Adult (латентный аутоиммунный диабет у взрослых). Согласно их определению, LADA - медленно прогрессирующая форма аутоиммунного диабета, первоначально управляемая с помощью диеты и пероральных сахароснижающих средств, прежде чем стать инсулинозависимой.

В ходе инициированного исследования были получены клинические данные, характеризующие особенности течения заболевания у пациентов с различными вариантами аутоиммунного сахарного диабета (с манифестным началом, LADA). Клиническая характеристика обследованных групп пациентов приведена в таблицах 1,2.

Таблица 1- Клиническая характеристика пациентов с сахарным диабетом

Показатели	LADA	СД1	СД2
Количество обследованных лиц	31 (23%)	37 (27,4%)	67 (49,6%)
из них, мужчин	12 (38,7%)	24 (64,9%) p₁=0,05	27 (40,3%) p ₁ >0,05; p₂=0,02
Возраст, лет	41,4 ± 11,6	30,5 ± 7,2 p₁<0,001	46,8 ± 9,0 p₁=0,008; p ₂ <0,001
Вес, кг	72,7±20,3	70,5±16,0 p ₁ >0,05	85,0±18,2 p₁=0,002; p₂<0,001
ИМТ, кг/м ²	25,3±4,9	23,6±4,6 p ₁ >0,05	30,6±6,0 p₁<0,001; p₂<0,001
Окружность талии, см	73,0 (69,0 - 78,0)	70,0 (68,0 - 74,)] p ₁ >0,05	89,0 (78,0 - 99,5) p₁<0,001; p₂<0,001
Стаж СД, лет	3,0 (0,7 - 6,0)	4,0 (1,1 - 6,0) p ₁ >0,05	2,5 (1,0 - 5,8) p ₁ >0,05; p ₂ >0,05
Возраст дебюта, лет	37,5±10,0	25,6±7,8 p₁<0,001	43,3±8,7 p₁=0,003; p₂<0,001
Продолжительность инсулинотерапии, годы	0,6 (0,1 - 4,0)	4,0 (1,1 - 6,0) p₁=0,03	0,8 (0,1 - 2,0) p ₁ >0,05; p₂=0,01
Суточная доза инсулина, ЕД/кг	0,46±0,21	0,59±0,18 p₁=0,03	0,51±0,18 p ₁ >0,05; p ₂ >0,05
HbA _{1c} , %.	8,6±3,2	8,4±2,3 p ₁ >0,05	8,4±2,2 p ₁ >0,05; p ₂ >0,05

Примечание: M±SD; Me(Q1-Q3), p₁ - уровень статистической значимости отличия значений показателей по сравнению с таковыми у больных LADA; p₂ - у пациентов с СД1

Достоверных различий между группами по стажу СД выявлено не было (Таблица 2). Распределение пациентов по полу в группе LADA и СД2 было сопоставимым. Обращало на себя внимание превалирование женщин среди пациентов с LADA, что отличало эту группу от СД1 (Таблица 1). Анализируя

распределение пациентов по возрасту в обследованных группах, отмечено, что пациенты с LADA значимо моложе пациентов с СД2, но старше, чем больные с СД1 (Таблица 1), это отражает характер заболеваемости этими вариантами СД, учитывая сравнимое распределение пациентов всех клинических групп по стажу заболевания. Масса тела пациентов с LADA достоверно не отличалась от таковой у больных СД1 и была меньше, чем у пациентов с СД2. Аналогичные различия между группами прослеживались и при анализе ИМТ, а также ОТ (Таблица 1). Анализ частоты диабетических микроангиопатий показал одинаковую их встречаемость в обследованных группах.

Таблица 2 - Распределение пациентов в зависимости от стажа сахарного диабета

Стаж заболевания	LADA (%)	СД1 (%)	СД2 (%)	p
До 4 лет	54,8	43,2	58,2	>0,05
От 4 до 5 лет	22,6	35,1	30,0	>0,05
От 5 до 10 лет	19,4	16,2	9,0	>0,05
Более 10 лет	2,2	5,4	3,0	>0,05

Анализ времени до развития нефропатии либо ретинопатии (при их отдельном учете) не выявил достоверных различий между группами пациентов. Ретинопатия диагностирована у 34,8% больных СД в общей выборке, причем тяжелая ретинопатия (пре- и пролиферативная) – у 3,0%. При СД2 частота ретинопатии составила 40,3%, в том числе тяжелой ретинопатии – 1,5%. При LADA – поражение сетчатки было выявлено у 35,5%, в т.ч. тяжелой ретинопатии – у 3,2% больных. Нефропатия была установлена в среднем у 29,6% больных СД по всем трем группам (СД1, СД2 и LADA), в том числе в стадии протеинурии – у 3,0%. При СД2 частота нефропатии составила 32,8%, а при LADA – 25,8%.

Артериальная гипертензия встречалась у 37,0% пациентов с СД в общей выборке. При LADA частота выявления артериальной гипертензии составила 29,0%, а при СД2 – 55,2% (p=0,02).

После стратификации клинических групп по признаку – наличие/отсутствие любого микрососудистого осложнения СД (ретинопатия, нефропатия) были получены отличающиеся от предыдущего анализа данные (Таблица 3).

В рассматриваемой выборке пациентов с СД1 стаж заболевания (Me (Q1-Q3)), при котором появлялись микрососудистые осложнения составил 8,0 (5,5-10,0) лет. При LADA развитие микроангиопатий происходило после 4-го года заболевания, т.е. в 2 раза быстрее (Таблица 3).

Сопоставление данных о наличии микрососудистых осложнений и функциональном состоянии β -клеток поджелудочной железы подчеркивают, что снижение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (как и при СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий (Таблица 4).

Аутоиммунный тиреоидит выявлен у 14,1% в общей группе пациентов с СД. Диагноз АИТ всем пациентам был выставлен ранее на основании сочетания «больших» диагностических критериев: первичный гипотиреоз (манифестный или стойкий субклинический) и наличие антител к ткани щитовидной железы и

ультразвуковые признаки ее аутоиммунной патологии (Клинические рекомендации Российской Ассоциации Эндокринологов по диагностике и лечению аутоиммунного тиреоидита у взрослых, 2002).

Таблица 3 - Продолжительность течения сахарного диабета в зависимости от срока развития микроангиопатий (Me (Q1-Q3))

Тип диабета	Стаж заболевания при отсутствии микроангиопатий, годы	Стаж заболевания при наличии микроангиопатий, годы
СД1	3,0 (0,3-4,5) $p_{1-2}>0,05$ $p_{1-3}>0,05$	8,0 (5,5-10,0) $p_{1-2}=0,01$ $p_{1-3}=0,04$
LADA	1,0 (0,2-3,0) $p_{2-3}>0,05$	4,0 (2,0-10,0) $p_{2-3}>0,05$
СД2	2,0 (0,5-3,0)	5,0 (1,9-6,5)

Примечание: p_{1-2} – уровень статистической значимости между группами пациентов с СД1 и СД2; p_{1-3} – между группами пациентов с СД1 и LADA; p_{2-3} – между группами пациентов с LADA и СД2

Таблица 4 - Базальная концентрация С-пептида у пациентов с сахарным диабетом в зависимости от наличия микроангиопатий (Me (Q₁-Q₃))

Тип диабета	С-пептид при отсутствии микроангиопатий, нг/мл	С-пептид при наличии микроангиопатий, нг/мл	Достоверность
СД 1	0,49 (0,23-0,77)	0,17 (0,14-1,00)	$p>0,05$
LADA	0,95 (0,75-1,78)	0,31 (0,15-0,90)	$p=0,02$
СД 2	2,31 (1,00-3,39)	0,83 (0,26-1,76)	$p=0,01$

Примечание: p – уровень статистической значимости в сравнении с показателем в группе пациентов без микроангиопатий

Обращал на себя внимание тот факт, что в нашей выборке у пациентов с LADA аутоиммунный тиреоидит регистрировался достоверно чаще, по сравнению как с СД2 (10,4%), так и с СД1 (5,4%; $p=0,02$). На момент обследования пациенты всех клинических групп находились в состоянии спонтанного или медикаментозного (пациенты с ранее диагностированным АИТ) эутиреоза, по показателям гормонального фона статистически значимых различий между подгруппами не наблюдалось.

Анализ различий по длительности СД до принятого условного уровня снижения базального С-пептида (концентрация базального С-пептида $<1,0$ нг/мл – сниженный, 1-3 нг/мл – сохранный, $>3,0$ нг/мл – повышенный резерв секреции

(DCCT, 1993) показал, что при LADA снижение значений содержания С-пептида развивалось достоверно позднее, чем при СД1 ($p=0,018$, F-критерий Кокса), что отчетливо проявлялось уже к 5 году болезни (Рисунок 1). Однако темпы прогрессирования снижения С-пептида при LADA были выше, чем при СД2 и различия между ними по этому критерию достоверно различались уже к 4 году заболевания ($p = 0,012$, F-критерий Кокса) (Рисунок 2).

При анализе различий по уровню стимулированного С-пептида на 120 мин ТТСП (снижением секреторного ответа β -клеток считали повышение С-пептида на 120-й мин ТТСП менее, чем в 1,5 раза относительно базального (Iwasaki Y., 1994; Vendrame F., 2004; Greenbaum C. J., 2008; Dons R. F., 2009)) было установлено, что у пациентов с LADA и с СД1 значения его концентрации достоверно ниже, чем при СД2, причем, эти различия отмечались как при стаже заболевания до 4-х лет, так и при большей продолжительности болезни. Уровень стимулированной секреции С-пептида имел прямую корреляцию с: ИМТ ($r=0,60$, $p<0,001$), ОТ ($r=0,61$, $p<0,001$), возрастом дебюта заболевания ($r=0,32$, $p=0,032$) и базальной секрецией С-пептида ($r=0,90$, $p<0,001$).

Результаты исследований говорят о том, что, несмотря на некоторое генетическое и иммунологическое сходство между сахарным диабетом 1 типа и LADA, существуют также значительные различия между этими типами в отношении спектра ауто-антител, Т-клеток и генетических факторов. Симптомы заболевания, взятые изолированно, не позволяют достоверно дифференцировать LADA и СД2. Обязательным для диагностики LADA является оценка маркеров аутоиммунного процесса, направленного против β -клеток. В проведенном нами исследовании LADA был подтвержден серологически лишь у 26% пациентов, у которых его подозревали на основании клинических критериев (S. Fourlanos, 2005) и у 10% пациентов, не удовлетворяющих этим критериям.

Аутоантитела хотя бы одного типа (GAD, ICA, или IAA) в крови выявлены у 23% обследованных пациентов с клиническим фенотипом СД2, что позволило идентифицировать LADA у данных больных. Это согласуется с данными литературы относительно доли LADA в структуре заболеваемости СД у лиц старше 35 лет (Borg H., 2001; Turner R., 1997; Urakami T., 1995; Дедов И. И., 2009).

Одновременно два типа аутоантител присутствовали у 17,8% пациентов с аутоиммунным СД (без статистически значимых различий между группами LADA и СД1). Антитела к островковым клеткам (ICA) определялись у 23,0 % пациентов в общей выборке. Детальный анализ показал, что среди больных с клиническим фенотипом СД2 ICA определялись у 22,4%, которые составляли 71,0% всех обследованных пациентов с LADA. Среди пациентов с СД1 ICA были идентифицированы у 24,3 % пациентов (Таблица 5).

Антитела к инсулину (IAA) выявлены у 12,6% пациентов в общей выборке. Причем, среди больных с клиническим фенотипом СД2 – у 3,1%, составлявших 9,7% всех обследованных пациентов с LADA. При СД1 IAA выявлены у 37,8% пациентов (Таблица 5).

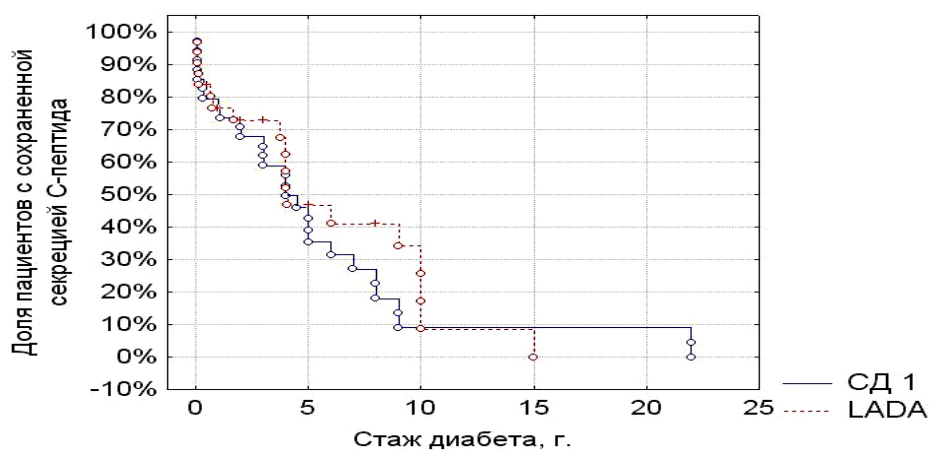


Рисунок 1 - Характеристика снижения базального С-пептида в сыворотке крови у больных LADA и СД1 в зависимости от длительности диабета. Пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным уровнем С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненной базальной секрецией С-пептида ($p=0,018$)

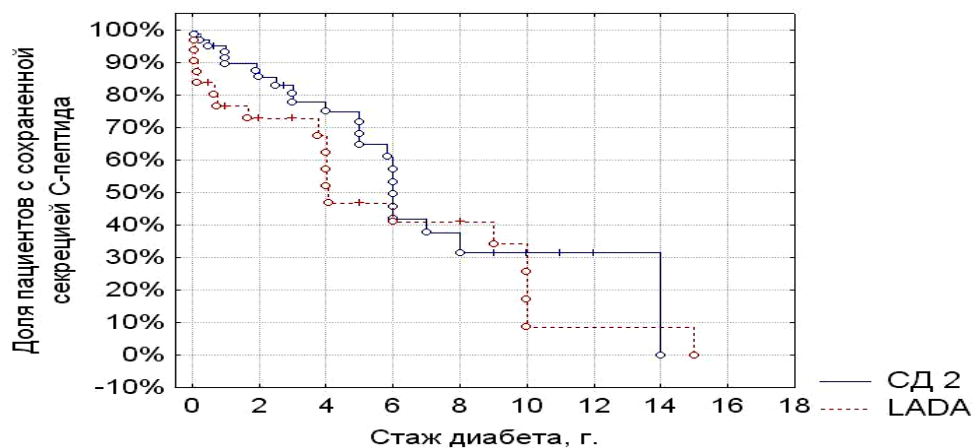


Рисунок 2 - Характеристика снижения базального С-пептида в сыворотке крови у больных LADA и СД2 в зависимости от длительности диабета. Пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным уровнем С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненной базальной секрецией С-пептида ($p = 0,012$)

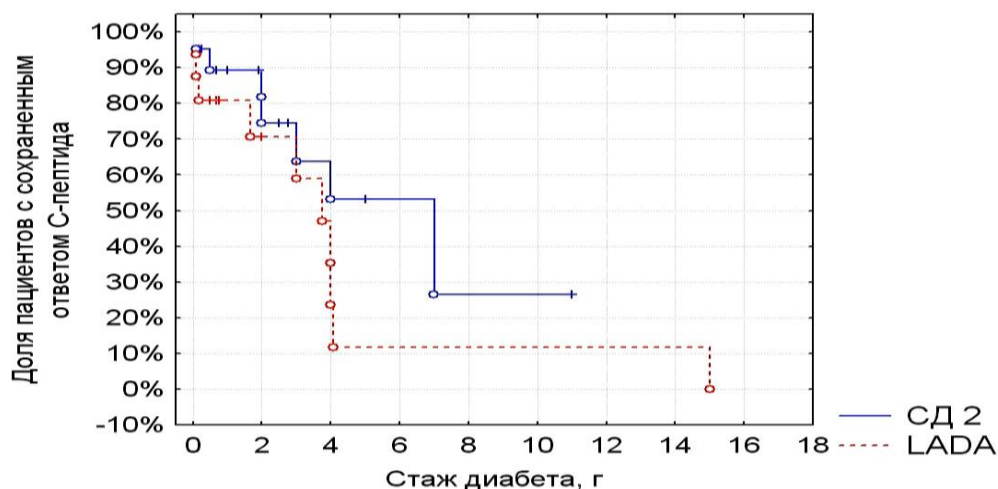


Рисунок 3 - Характеристика секреторного ответа С-пептида на 120 мин ТТСП у больных СД2 и LADA в зависимости от длительности диабета ($p=0,04$). Пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным секреторным ответом С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненным ответом

Антитела к GAD65 выявлены у 11,1% пациентов в общей выборке. Среди пациентов с клиническим фенотипом СД2 – у 12,2%, что составляет 38,7% всех обследованных пациентов с LADA. При СД1 GAD65Ab определялись у 8,1% пациентов (Таблица 5).

Таблица 5 - Частота выявления и концентрация (Me(25%;75%)) антител к GAD, ICA и IAA в сыворотке крови больных СД1 и LADA

Показатели (антитела)		LADA n=31	СД1 n=37	Уровень статистической значимости (p)
GAD	частота	38,7% (12)	8,1% (3)	p=0,003
	концентрация, Ед/мл	0,85 [0,53; 1,38]	0,49 [0,41; 0,58]	p=0,07
ICA	частота	71,0% (22)	24,3 % (9)	p<0,001
	концентрация, опт.ед/мл	0,44 [0,35;0,56]	0,20 [0,14; 0,36]	p=0,04
IAA	частота	9,7% (3)	37,8% (14)	p=0,01
	концентрация, Ед/мл	5,49 [5,02; 6,30]	8,04 [5,33; 8,83]	p>0,05

Концентрация GAD65Ab и ICA были выше у пациентов с LADA (Таблица 5). Отмечена отрицательная корреляция уровней ICA с возрастом манифестации заболевания ($r = -0,36$, $p=0,002$) и возрастом пациентов ($r=-0,32$, $p=0,008$).

Достоверных отличий концентраций IAA между группами пациентов с аутоиммунным СД выявлено не было (Таблица 5). Отмечена отрицательная корреляция содержания IAA с возрастом манифестации заболевания ($r = -0,24$, $p=0,04$).

Клинические особенности аутоиммунных тиреопатий

Болезнь Грейвса (БГ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ) являются самыми распространенными аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, основное звено патогенеза которых – дисбаланс факторов клеточного и гуморального иммунитета. Детальные механизмы этих заболеваний до сих пор окончательно не выяснены. Для определения специфических особенностей иммунопатогенеза АИТП (БГ, АИТ) и прогнозирования их функциональных исходов было проведено обсервационное когортное исследование, клиническая характеристика пациентов обеих групп представлена в таблице 6.

Среди антитиреоидных ауто-АТ выделяют анти-ТГ, анти-ТПО, анти-ТГ-ТПО и ауто-АТ к рецептору ТТГ. При этом долевое участие каждого из вышеуказанных семейств ауто-АТ в суммарном цитотоксическом, в том числе комплемент-зависимом, эффекте на ЩЖ до сих пор остается не ясным (Wan Q., McCormick D.J., David C.S., Kong Y.C., 1998; Сучков С.В., Алекберова З.С., Палеев Ф.Н. и др., 2005).

В нашем исследовании подтверждена функциональная взаимосвязь между титром АТ-ТПО и цитотоксическим потенциалом клеточного иммунитета, так, среди всех пациентов с АИТП обнаруживалась умеренной силы прямая корреляционная связь титра АТ-ТПО и абсолютным количеством CD8+

лимфоцитов ($r=0,41$; $p=0,03$), а также абсолютным количеством CD4⁺-лимфоцитов ($r=0,38$; $p=0,04$). Подобных ассоциаций не выявлено между параметрами клеточного иммунитета при АИТП и титром АТ-рТТГ, АТ-ТГ.

Таблица 6 - Общая клинико-лабораторная характеристика пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и болезнью Грейвса (БГ; Me (Q1-Q3))

Показатель	Здоровые доноры	АИТ, гипотиреоз	АИТ, эутиреоз	БГ, эутиреоз	БГ, гипертиреоз
Количество пациентов, n	30	10	19	14	31
Средний возраст пациентов, лет	47,3 (37,2-51,0)	50,0 (31,0-53,0)		47,0 (35,0-53,0)	
Продолжительность заболевания (с момента выявления), лет	-	7,5 (1,9 – 13,1)		2,6 (1,0 – 4,3)	
Курение, %	-	23,0		29,4	
Узловые образования, %	-	42,9 (12)		27,8 (12)	
Объем щитовидной железы (на момент обследования), мл	13,7 (7,4-17,9)	14,1 (3,6-24,5)	17,6 (13,8-25,4)	15,2 (11,1-19,3)	32,6 (17,5-50,1)
Уровень ТТГ, мМЕд/л	1,5 (0,8-2,7)	32,7 (26,2-39,1)	2,6 (2,3-2,8)	0,29 (0,02-0,56)	0,05 (0,01-0,19)
Концентрация св.Т4, пмоль/л	18,7 (12,1-21,1)	5,5 (2,5-8,7)	17,0 (15,9-18,3)	15,7 (15,3-16,2)	56,8 (28,4-71,2)
Концентрация св.Т3, пмоль/л	3,4 (2,3-4,2)	1,8 (1,6-2,0)	2,5 (2,0-3,3)	3,8 (2,9-4,8)	6,5 (2,3-13,0)
Концентрация АТ-ТПО, МЕд/л	менее 30	636,0 (366,0-782,0)		611,0 (201,0-824,2)	
Концентрация АТ-ТГ, МЕд/л	менее 30	193,6 (65,8-249,0)		312,4 (212,1-398,9)	
Концентрация АТ-рТТГ, Ед/л	не определяемая	0,5 (0,0-0,8)		33,2 (7,5-34,7)	

Примечание: p_1 – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p_2 – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p_3 – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с БГ в фазе эутиреоза

У пациентов с АИТ концентрации антител к ТПО в крови в фазе гипотиреоза и эутиреоза значимо не различались. При БГ уровень данных антител у лиц в фазе

эутиреоза был достоверно ниже, чем у пациентов с тиреотоксикозом. В свою очередь, концентрация анти-ТПО у больных АИТ в фазе эутиреоза достоверно превышала аналогичный показатель у пациентов с БГ с таким же функциональным состоянием щитовидной железы (Таблица 7).

Наряду с образованием вышеуказанных ауто-АТ, у больных АИТ и БГ отмечена индукция образования ауто-АТ к рецептору ТТГ. Оценивая содержание в крови АТ-рТТГ у пациентов с АИТ, установили наличие незначительных концентраций данного вида антител, не превышающих диагностически значимый порог и не изменяющихся в зависимости от гормонального статуса щитовидной железы ($p > 0,05$).

Таблица 7 - Концентрация антител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Ме (Q₁-Q₃))

Группа пациентов		Анти-ТПО, МЕ/мл	Анти-ТГ, МЕд/л	Анти-рТТГ, Ед/л
АИТ (n=29)	Гипотиреоз (n=10)	479,90 (380,10-780,00)	144,5 (66,5-221,3)	0,50 (0,00-0,60)
	Эутиреоз (n=19)	764,00 (507,50-885,00) $p_1 > 0,05$	242,9 (114,2-370,6) $p_1 > 0,05$	0,64 (0,00-1,00) $p_1 > 0,05$
БГ (n=45)	Эутиреоз (n=14)	9,00 (5,70-10,25) $p_2 = 0,04$	315,3 (160,1-415,7) $p_1 > 0,05$	3,50 (2,65-26,65) $p_2 = 0,007$
	Гипертиреоз (n=31)	585,00 (159,60-800,00) $p_3 = 0,02$	389,1 (287,2-450,9) $p_1 > 0,05$	34,70 (33,20-37,07) $p_3 = 0,006$

Примечание: p_1 – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p_2 – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p_3 – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с БГ в фазе эутиреоза; n – количество обследованных лиц

При БГ концентрация анти-рТТГ при гипертиреозе была значительно выше ($p = 0,006$), чем при эутиреоидном состоянии щитовидной железы. Сравнение данного показателя между группами пациентов с изучаемыми тиреопатиями в фазе эутиреоза закономерно показало повышенные концентрации антител к рТТГ при БГ ($p = 0,007$) (Таблица 7).

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом и тиреопатиями

В настоящее время известно, что механизмы развития аутоиммунного повреждения поджелудочной и щитовидной желез сопряжены с активацией клеточного и гуморального звеньев иммунитета в результате срыва толерантности к собственным антигенным структурам (Atkinson M., 2005; Cools N. et al., 2007; Репина Е.А., 2010; Buckner J.H., 2010). Однако, несмотря на многочисленные исследования в этой области, на сегодняшний день отсутствуют единые представления о факторах, способствующих поддержанию аутореактивных иммунных процессов в эндокринных железах. Поскольку непосредственными

участниками воспаления, протекающего в органе-мишени, являются лимфоциты, в проведенном нами исследовании был рассмотрен их субпопуляционный состав в крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями.

У пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза статистически значимых различий в значениях показателей в зависимости от наличия микроангиопатий (ретинопатия, нефропатия) выявлено не было. В связи с этим последующая оценка содержания лимфоцитов в крови и их субпопуляционного состава у больных СД1 и LADA проводилась только в зависимости от нозологического варианта сахарного диабета.

Основными результатами явились изменения количества CD3+- и CD16+CD56^{low}-лимфоцитов. Относительное содержание CD3+-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров составило 69,70 (65,94-70,90) %. Количество CD3+-лимфоцитов у больных СД1 [73,69 (70,86-76,18) %] и у пациентов с LADA [75,81 (73,13-79,31) %] достоверно превышало таковое у здоровых лиц ($p=0,04$ и $p=0,008$, соответственно). Содержание CD16+CD56^{low}-клеток у пациентов с СД1 [13,71 (10,37-17,07) %] и с LADA [11,60 (9,10-14,36) %] оказалось значимо ниже их числа у здоровых доноров [17,24 (16,18-19,88) %, $p=0,03$ и $p=0,007$, соответственно]. При этом у пациентов с СД2 (группа сравнения) подобные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, относительно значений в контроле, обнаружены не были, что подчеркивает связь выявленных отклонений клеточного состава с развитием сахарного диабета аутоиммунного генеза.

Аутоиммунные тиреопатии характеризовались аналогичными изменениями числа CD3+- и CD16+CD56^{low}-клеток. Так относительное количество CD3+-лимфоцитов у больных АИТ в состоянии эутиреоза [75,22 (74,32-76,06) %], а также у пациентов с БГ в эутиреозе [75,00 (72,34-75,45) %] и гипертиреозе [74,06 (69,30-79,18) %] достоверно превышало количество CD3+-клеток у лиц контрольной группы ($p=0,001$, $p=0,01$ и $p=0,02$, соответственно). Содержание CD16+CD56^{low}-лимфоцитов в крови у здоровых доноров составляло $0,84(0,66-0,87) \cdot 10^9/\text{л}$, а у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями количество их оказалось в 2,5 и более раз ниже – $0,33(0,24-0,43) \cdot 10^9/\text{л}$ – у больных АИТ с гипотиреозом ($p<0,001$); $0,24(0,15-0,30) \cdot 10^9/\text{л}$ – у пациентов в эутиреоидной фазе АИТ ($p<0,001$); $0,21(0,16-0,25) \cdot 10^9/\text{л}$ – у пациентов с БГ в стадии эутиреоза ($p=0,006$); $0,19(0,16-0,26) \cdot 10^9/\text{л}$ – при гипертиреозе у пациентов с БГ ($p<0,001$).

Поскольку CD16+CD56^{low}-лимфоциты являются иммунорегуляторными клетками звена врожденного иммунитета (Jaeger B.N., Vivier E., 2012; Nielsen N. et al., 2012), то недостаток их количества может отягощать аутореактивное повреждение поджелудочной и щитовидной желез. Можно предположить, что дефицит CD16+CD56^{low}-клеток является одним из факторов, ответственным за формирование эндокринопатий, поскольку снижение количества лимфоцитов-киллеров было характерно только для аутоиммунных типов диабета (не выявлялось при СД2), а также определялось при АИТ и БГ, независимо от уровня тиреоидных гормонов. В данном случае увеличение количества CD3+-клеток можно рассматривать с позиции утраты контроля над аутореактивными клонами лимфоцитов и активации Т-клеточного звена иммунитета.

Характеристика цитокин-секретирующей активности мононуклеарных лейкоцитов и количества лимфоцитов, несущих комплементарные рецепторы у пациентов с аутоиммунными сахарным диабетом и тиреопатиями

Процесс развития аутоиммунных эндокринопатий, состоящий из многостадийного взаимодействия между иммунокомпетентными клетками, с участием тканеспецифических антител, сопряжен с продукцией цитокинов иммунокомпетентными клетками (Atkinson M.A., 2005; Swain M. et al., 2005; Jiskra J. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт., 2011). В связи с этим нами была проведена оценка концентрации IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α и sTNF-R1 в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови и количества лимфоцитов в крови, презентирующих рецепторы к указанным цитокинам, а также – Fas, FasL-лимфоцитов и концентрации sFasL.

У обследованных больных аутоиммунным СД было выявлено усиление продукции IL-2 и увеличение в крови числа лимфоцитов, несущих мембранные рецепторы к IL-4 (CD124⁺-клетки), концентрация IL-4 оставалась на уровне контрольных значений (кроме пациентов с LADA, имеющих микроангиопатии) (Рисунок 4). По нашему мнению, данные факты являются отражением дисбаланса механизмов антагонизма, в норме существующих между Th1- и Th2-лимфоцитами, что может способствовать хронической стимуляции пролиферации T-лимфоцитов IL-2 и поддержанию аутореактивных процессов в поджелудочной железе. Подтверждением связи нарушения в системе цитокинов IL-2 и IL-4 с развитием аутоиммунного СД является сохранение баланса повышенной продукции IL-4 и увеличенного числа CD124⁺-лимфоцитов в крови (при повышенных концентрациях IL-2) у пациентов с СД2, относительно соответствующих значений у здоровых доноров (Рисунок 4).

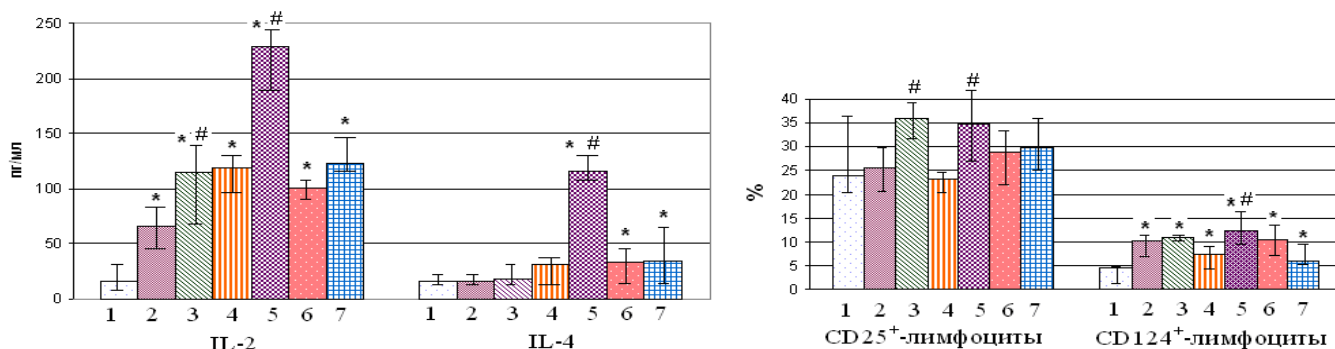


Рисунок 4 - Содержание IL-2, IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентирующих рецепторы к IL-2 (CD25⁺-лимфоциты), к IL-4 (CD124⁺-лимфоциты) (%) у пациентов с сахарным диабетом

Примечание (здесь и на рисунке 5): 1 – здоровые доноры; 2 – больные сахарным диабетом 1 типа; 3 – больные сахарным диабетом 1 типа с микроангиопатиями; 4 – больные латентным аутоиммунным диабетом взрослых; 5 – больные латентным аутоиммунным диабетом взрослых с микроангиопатиями; 6 – больные сахарным диабетом 2 типа; 7 – больные сахарным диабетом 2 типа с микроангиопатиями; * - достоверность различий с показателем у здоровых доноров; # - достоверность различий с показателем в группе пациентов без микроангиопатий. Здесь и на рисунках 5-8: для каждой группы представлены медиана, 25% и 75% квантили

Была отмечена корреляционная зависимость между увеличением базальной продукцией IL-2 и уровнем гликированного гемоглобина HbA1c ($r=0,36$, $p<0,05$), а также базальным уровнем С-пептида в сыворотке крови ($r=0,26$; $p<0,05$).

Характерным для больных СД1 и LADA оказалось значимое снижение концентрации sTNF-R1 в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови (Рисунок 5). Известно, что sTNF-R1 является регулятором провоспалительного действия TNF- α (Locksley R.M. et al., 2001; Wajant H. et al., 2003). Можно предположить, что дефицит растворимой формы рецептора к TNF- α приводит к тому, что концентрация воздействующего на клетки-мишени TNF- α возрастает, несмотря на то, что продукция самого цитокина не увеличивается.

Основными результатами изучения состояния системы IL-2, IL-4, TNF- α и их рецепторов у больных аутоиммунным СД, имеющих диабетические микроангиопатии, явились данные о повышении концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов IL-2, IL-4 и TNF- α , а также увеличении количества CD25⁺-, CD124⁺-, CD120⁺-лимфоцитов в крови у пациентов с LADA. Значения данных параметров превышали аналогичные величины у здоровых доноров, у пациентов с LADA, не имеющих микроангиопатий, и у больных СД1 и СД2 с нефро-, ретинопатией (Рисунок 4, 5).

Таким образом, нами установлено, что раннее (по сравнению с СД1) развитие микроангиопатий при LADA происходит на фоне повышенного уровня продукции лимфоцитами цитокинов IL-2, IL-4, TNF- α , а также резкого падения концентрации С-пептида в крови (Таблица 4).

Ряд исследований последних лет указывает на ангиопротективные свойства С-пептида (Li Z. et al., 2003; Maciejwska-Jeske M. et al., 2011; Vasic D. et al., 2012). Поэтому, можно заключить, что подобная цитокин-продуцирующая активность лимфоцитов в сочетании с метаболическими нарушениями вносит значимый вклад в механизмы и сроки развития эндотелиальной дисфункции.

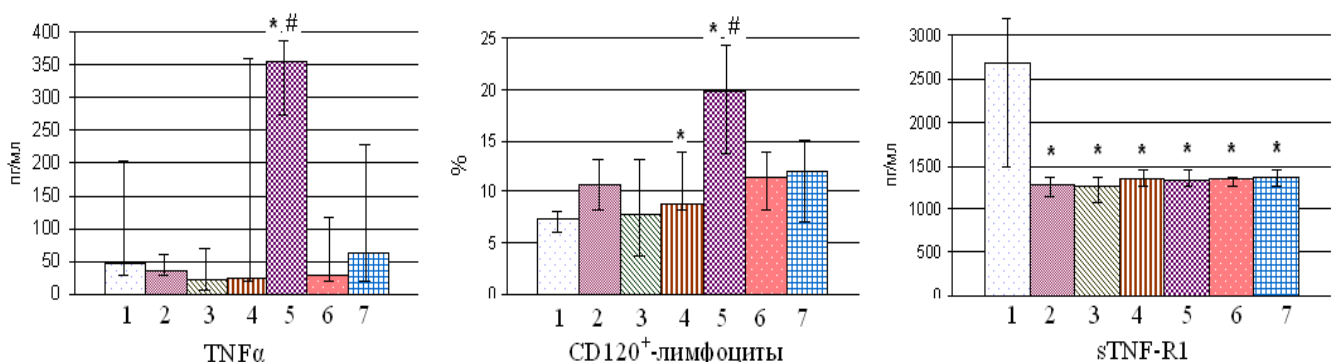


Рисунок 5 - Содержание TNF- α , растворимого рецептора к TNF- α (sTNF-R1) в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF- α (CD120⁺-лимфоциты) (%), у пациентов с сахарным диабетом. Здесь и на рисунке 6,8: * - достоверность различий с показателем у здоровых доноров

В нашем исследовании отмечено повышение базальной продукции IFN- γ мононуклеарными лейкоцитами крови у всех пациентов с СД относительно лиц контрольной группы [0,0 (0,0 - 20,0) пг/мл; $p<0,01$] без достоверных различий

между подгруппами пациентов с различными вариантами СД. Митоген-стимулированная продукция у всех пациентов с СД значимо ($p < 0,01$) отличалась от контрольных значений в сторону уменьшения, без существенных различий между подгруппами пациентов с разными вариантами СД.

При оценке базальной продукции IL-10 установлен достоверно более высокий ее уровень у пациентов всех клинических групп СД относительно лиц контрольной группы 6,0(0,0; 50,0) пг/мл, самые высокие показатели секреции среди указанных групп у лиц с СД типа 2 [605,1(194,9 - 2077,0)] пг/мл, затем - при LADA [383,1(50,0 - 733,1)] пг/мл, и наименьшие - у больных СД типа 1 - 100,0(0,0 - 1837,7) пг/мл. Во всех клинических группах IL-10-секреторная активность мононуклеаров крови (базальная и стимулированная) превышала уровень контрольной группы ($p < 0,01$). Наиболее высокий уровень ФГА-стимулированной продукции IL-10 отмечался у пациентов, страдающих LADA и СД типа 2, относительно низкий (соответствующий показателю здоровых доноров) – также у больных СД типа 1 без статистически значимых межгрупповых различий. Количество IL10R-лимфоцитов пациентов с СД также повышалось относительно здоровых доноров [5,0(3,3 – 7,2) %], количество их у больных LADA [8,7(7,3 – 9,6) %] превышало соответствующий уровень в группах СД1 и СД2, но без достижения уровня статистической значимости.

Высокий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при LADA свидетельствует о повышении супрессорной активности мононуклеарных лейкоцитов, которая, возможно, имеет протективное значение в отношении аутоиммунной деструкции β -клеток и, в совокупности с другими иммунологическими факторами, детерминирует постепенное развитие инсулиновой недостаточности. Напротив, низкий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 при СД типа 1 свидетельствует в пользу большей Th1 поляризации иммунного ответа при данном клиническом варианте аутоиммунного диабета.

Согласно полученным данным, содержание лимфоцитов, несущих Fas(CD95+), в крови больных LADA составило $14,7 \pm 5,6\%$ и было статистически значимо выше, чем в группах пациентов с СД1 и СД2 (Таблица 8). Данный факт свидетельствует о большей их готовности к Fas-опосредованному апоптозу при LADA. Количество лимфоцитов, экспрессирующих Fas-L (CD95L+), в крови больных LADA составляло $86,7 \pm 6,8\%$, что также достоверно выше, чем при СД1 и СД2. В то же время, при LADA абсолютное содержание этих клеток было меньше, чем при СД1 (Таблица 8). В общей выборке пациентов с СД увеличение количества лимфоцитов, несущих Fas-L прямо коррелировало с повышением концентрации антител ICA ($r=0,82$, $p < 0,05$), максимальная концентрация данного вида аутоантител регистрировалась у пациентов с LADA.

Продукция мононуклеарными лейкоцитами растворимой формы Fas-L (sFas-L) также была максимальной при LADA (Таблица 8). В отличие от мышинных моделей, где sFasL не оказывает влияние на элиминацию аутореактивных клонов лимфоцитов, так как не обладает апоптотической активностью, в организме человека sFasL способствует элиминации Т-лимфоцитов «памяти» (CD45RB^{low}) из циркуляции, что естественно может влиять на темпы развития и выраженность

аутоиммунного инсулита [Todaro M., Zeuner A., Stassi G., 2004]. Таким образом, изменение активности системы Fas/Fas-L играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе аутоиммунного сахарного диабета [Потапнев М.П., 2002; Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003].

Таблица 8 - Экспрессия Fas, Fas-L на лимфоцитах и продукция мононуклеарными лейкоцитами sFas-L при сахарном диабете (M±SD)

Показатели	контроль n=30	Пациенты с сахарным диабетом		
		LADA n=31	СД1 n=37	СД2 n=67
Fas (CD95+), %	10,83±1,13	14,7±5,6*	9,7±6,5 p₁<0,01	11,4±6,2 p₁=0,01 p ₂ =0,19
Fas (CD95+), тыс./мл	150±50	269±120*	209±200 p ₁ =0,15	218±122 p ₁ =0,06 p ₂ =0,78
Fas-L (CD95L), %	60,62±2,42	86,7±6,8*	72,2±14,0* p₁<0,01	80,7±8,3* p₁<0,01 p₂<0,01
Fas-L (CD95L), тыс./мл	1250±224	1462±326*	1831±1024* p ₁ =0,06	1534±157* p ₁ =0,14 p₂=0,02
Базальная продукция sFas-L (индуктор апоптоза), нг/мл	Ниже диапазона чувствительности тест-системы	0,24±0,08*	0,21±0,13* p ₁ =0,27	0,16±0,05* p₁<0,01 p₂<0,01
ФГА-стимулированная продукция sFas-L, нг/мл		0,26±0,14*	0,18±0,05* p₁<0,01	0,17±0,07* p₁<0,01 p ₂ =0,44

Примечание:* – отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$; p₁ – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя больных LADA, p₂ – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя пациентов с СД1 (критерий Манна – Уитни).

У пациентов с аутоиммунными тиреопатиями при оценке состояния системы цитокинов IL-2, IL-4 и их рецепторов выявлена зависимость изменения концентрации IL-2 от уровня тиреоидных гормонов. Содержание IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов у пациентов в фазе гипотиреоза оказалось ниже контрольных значений, в то время как в фазе гипертиреоза - регистрировалось повышение концентрации IL-2 в культуральных средах (Рисунок 6). Полученные результаты подтверждают данные литературы о связи тиреоидного статуса с

активностью иммунных реакций (Красных М.С. и соавт., 2004; Botella-Carretero J. et al., 2005; Hodkinson C.F. et. al., 2009; Ланин Д.В. и соавт. 2011).

При аутоиммунных тиреопатиях (подобно аутоиммунному сахарному диабету) установлено увеличение количества лимфоцитов крови, презентующих рецептор к IL-4, по сравнению с таковым у здоровых лиц, при отсутствии изменений концентрации IL-4 в супернатантах клеточных культур (Рисунок 6).

Комплексная оценка состояния системы TNF- α у пациентов с тиреопатиями аутоиммунного генеза выявила угнетение базальной и митоген-стимулированной продукции TNF- α мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro*, снижение содержания sTNF-R1, а также уменьшение количества лимфоцитов, презентующих мембраносвязанный рецептор к TNF- α , как при АИТ, так и при БГ (Рисунок 7, 8).

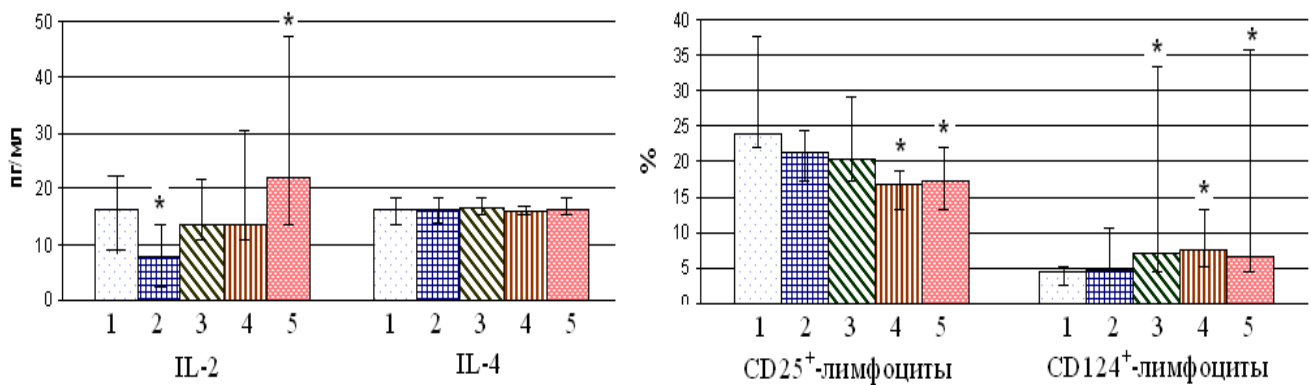


Рисунок 6 - Содержание IL-2 и IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2 (CD25⁺-лимфоциты) и к IL-4 (CD124⁺-лимфоциты) (%), у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Примечание (здесь и на рисунках 7, 8): 1 – здоровые доноры; 2 – больные аутоиммунным тиреоидитом с гипотиреозом; 3 – больные аутоиммунным тиреоидитом в состоянии эутиреоза; 4 – пациенты с болезнью Грейвса в состоянии эутиреоза; пациенты с болезнью Грейвса с гипертиреозом.

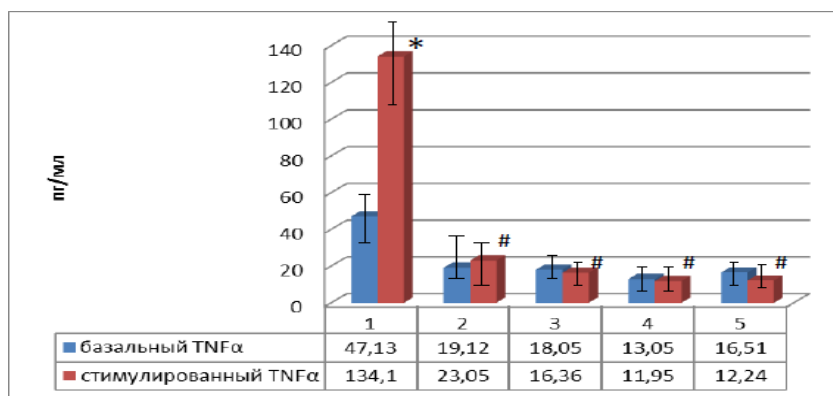


Рисунок 7 - Концентрация TNF- α (пг/мл) в супернатантах интактных и митоген-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у больных аутоиммунными тиреопатиями

Примечание: * - достоверность различий с показателем в интактной культуре клеток здоровых доноров; # - достоверность различий с показателем в ФГА-стимулированной культуре клеток здоровых доноров

М. LaVue et al. (2004) показано, что при аутоиммунном воспалении в ткани щитовидной железы реализуются механизмы, направленные на ограничение цитотоксического воздействия TNF- α как на фолликулярные клетки, так и на лимфоциты. Обнаруженные нами изменения, возможно, следует трактовать как ограничение TNF- α -опосредованного апоптоза аутореактивных лимфоцитов и поддержание воспалительного процесса в щитовидной железе.

Обобщая сказанное, можно утверждать, что у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом и аутоиммунными тиреопатиями нарушен баланс цитокиновой сети.

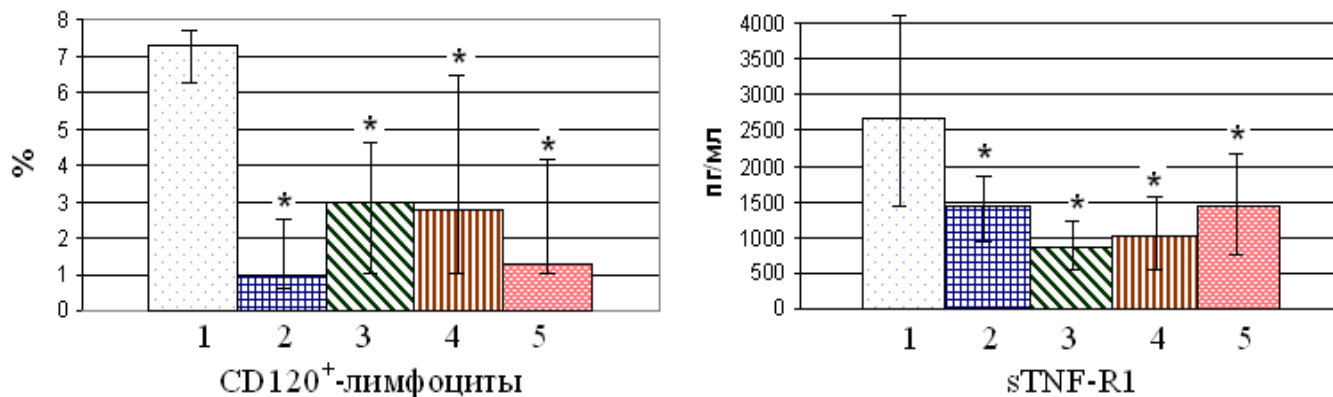


Рисунок 8 - Количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF- α (CD120⁺-лимфоциты) (%), и содержание растворимого рецептора к TNF- α (sTNF-R1) в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Наибольшие изменения концентрации IL-2, IL-4 и TNF- α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и отклонения в презентации мембран-ассоциированных рецепторов к указанным цитокинам на циркулирующих лимфоцитах крови отмечались в условиях выраженных гормонально-метаболических нарушений: при появлении микроангиопатий у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза, а также при гипо- и гипертиреозе у больных аутоиммунными тиреопатиями (Рисунки 4-8).

Экспрессия рецепторов IL-2, IL-4 и TNF- α в ткани щитовидной железы у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (по результатам иммуногистохимического исследования)

Аналізу подвергнуто 27 образцов ткани ЩЖ, полученных после проведенных субтотальных или тотальных тиреоидэктомий. Образцы разделены следующим образом: 19 образцов пациентов с БГ, 4 – с АИТ, 4 образца - пациентов с многоузловым коллоидным (не иммунным) зобом (группа сравнения).

Было установлено, что рецепторы к IL-2, IL-4 экспрессируют как инфильтрирующие ЩЖ лимфоциты и моноциты, так и фолликулярный эпителий ЩЖ, и в частности, внутриклеточные структуры фолликулярного эпителия (лизосомы). Уровень экспрессии варьировался от минимально выраженного до диффузного и яркого свечения, что позволило применить балльную оценку выраженности экспрессии рецептора цитокина (от 1 до 3). Также фиксировался характер окраски по количеству клеток: CD25⁺ и CD124⁺ - все клетки в препарате

окрашивались с одинаковой интенсивностью, а TNF-RI – на фоне неокрашенных присутствовало разное количество окрашенных клеток. Во всех препаратах, где присутствовали лимфоциты, отмечалось их окрашивание всеми тремя антителами. В некоторых случаях при детекции CD25+ и CD124+ в клетках на фоне монотонного окрашивания присутствовала более яркая зернистость (лизосомы). Коллоид окрашивался с разной интенсивностью, что позволило также применить балльную оценку выраженности свечения (от 1 до 3).

При всех изучаемых вариантах АИТП и при не иммунных вариантах тиреопатий (коллоидный зоб) фиксировалась экспрессия рецептора к IL-2 (CD25+) фолликулярным эпителием, в коллоиде и клетками лимфоплазмочитарной инфильтрации и мигрирующими в паренхиму ЩЖ макрофагами (Рисунок 9). Выраженность экспрессии рецептора к IL-2 коррелировала с выраженностью пролиферативных процессов в ЩЖ, независимо от нозологического варианта ($r=0,7$, $p=0,02$). Анализ экспрессии CD25+ в подгруппах пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами не выявил значимых его различий, кроме пациентов с БГ и наличием онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия ЩЖ, где экспрессия CD25+ была значимо ниже относительно как пациентов с коллоидным зобом, АИТ и другими вариантами БГ.

Экспрессия CD124+ фиксировалась на фолликулярном эпителии ЩЖ, ярче всего в коллоиде и лимфоплазмочитарными инфильтратами (Рисунок 10). Экспрессия рецептора к IL-4 не является специфичной для конкретного варианта тиреопатий, так как фиксировалась при всех нозологиях, не коррелировала с клиническими проявлениями заболевания, такими как объем ЩЖ, возраст, пол, склонность к узлообразованию, стаж заболевания и тд.

Показано, что источником экспрессии рецептора к TNF- α являются только иммуноциты, инфильтрирующие ткань ЩЖ. Клетки, экспрессирующие TNF-RI отличались крупным размером, имели крупное ядро, неровные контуры, что позволило причислить их к моноцитарно/макрофагальной системе. Степень выраженности клеточной инфильтрации с экспрессией TNF-RI сильно варьировалась, как при БГ, так и при АИТ, не наблюдаясь при неиммунных тиреопатиях (коллоидный пролиферирующий зоб, рисунок 11, Е). При анализе клинических и гормональных параметров получены прямые корреляционные взаимосвязи между выраженностью клеточных инфильтратов, экспрессирующих TNF-RI и возрастом пациентов с АИТП ($r=0,5$, $p=0,01$), а также с образованием «узлов» по данным ультразвукового исследования ($r=0,6$, $p=0,01$) и курением ($r=0,5$, $p=0,04$). Также получена обратная корреляционная зависимость между выраженностью инфильтрации ЩЖ с экспрессией TNF-RI и уровнем ТТГ ($r= - 0,4$, $p=0,03$), что связывает характер инфильтрата и изменение функционального состояния ЩЖ при АИТП. Во всех случаях, в непосредственной близости с клеточными инфильтратами, экспрессирующими TNF-RI происходила специфическая реакция паренхимы с образованием тиреоидных фолликулов с клетками Ашкенази-Гюртле, выраженность реакции варьировалась от единичных клеток до тотальной онкоцитарной трансформации тиреоидного эпителия (Рисунки 11, 12).

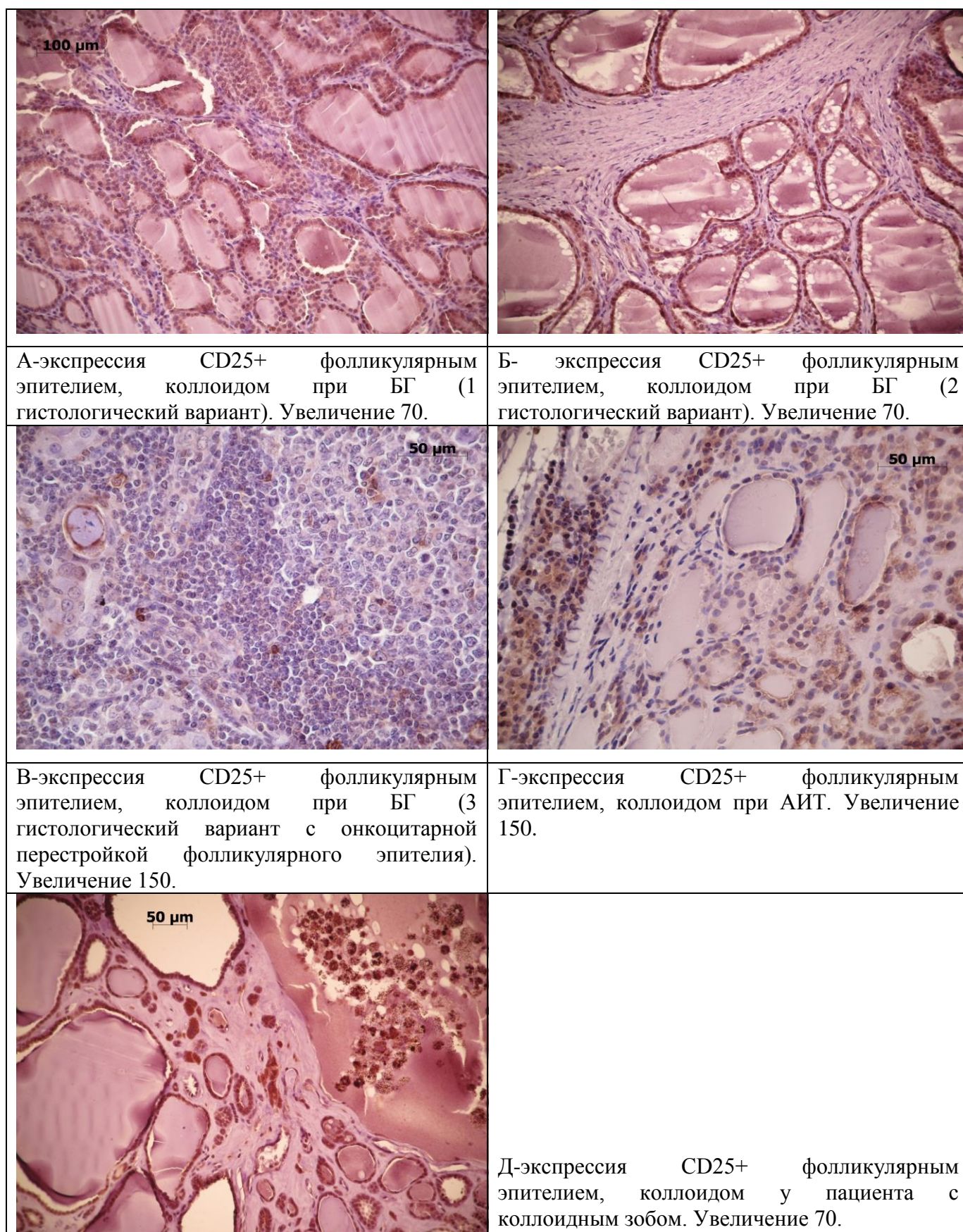


Рисунок 9 - Варианты экспрессии CD25+ в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г) и коллоидном пролиферирующем зобе (Д).

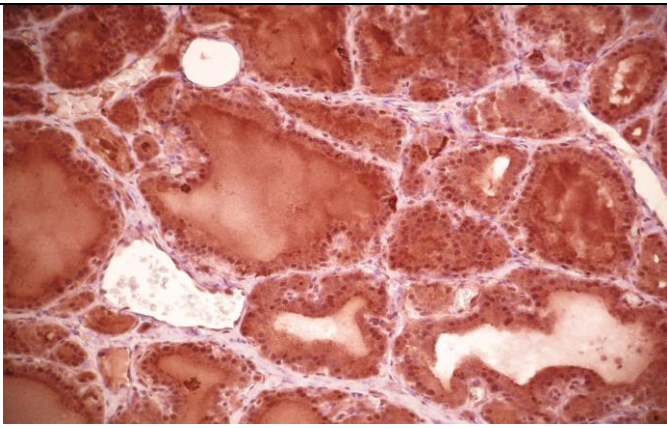
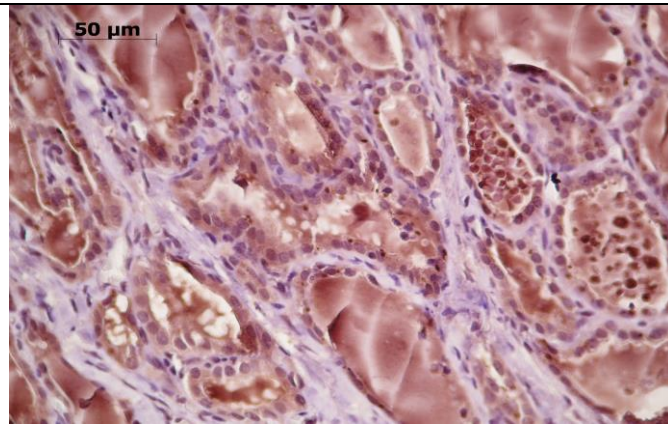
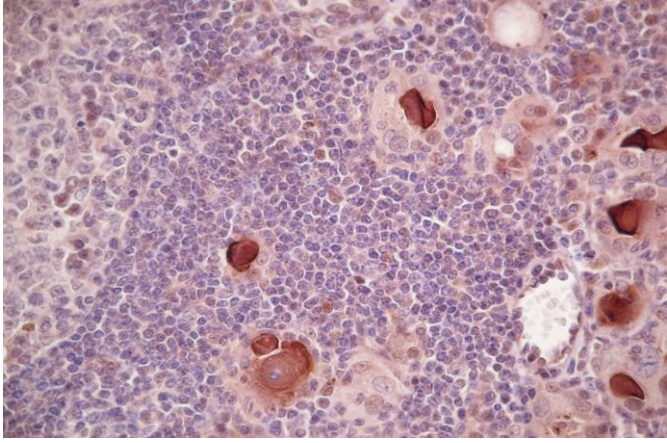
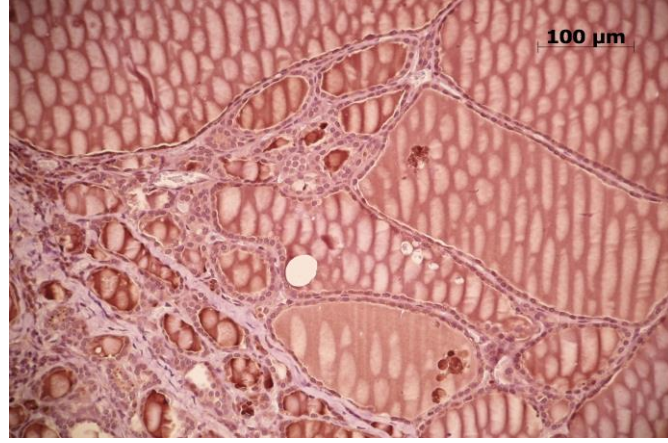
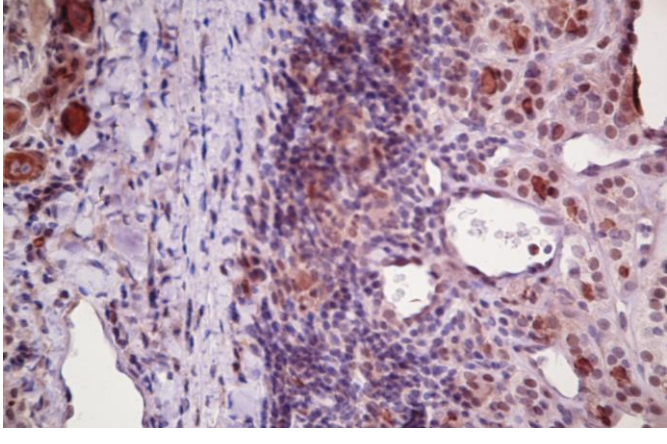
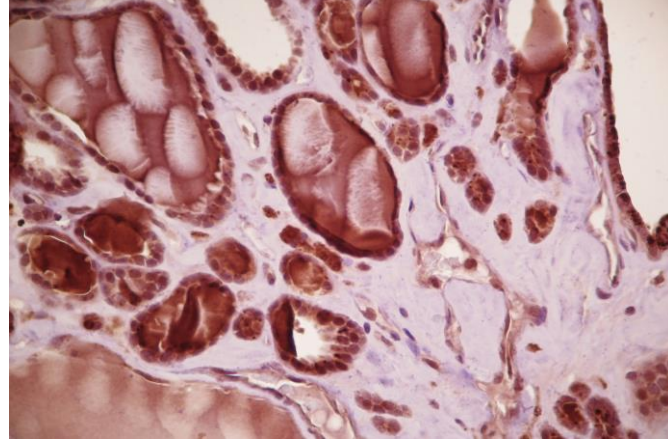
	
<p>А-экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом при БГ (1 гистологический вариант). Увеличение 70.</p>	<p>Б-экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом при БГ (2 гистологический вариант). Увеличение 150.</p>
	
<p>В-экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом при БГ (3 гистологический вариант с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия). Увеличение 150.</p>	<p>Г-экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом при АИТ. Увеличение 70.</p>
	
<p>Д- экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом при АИТ. Увеличение 150.</p>	<p>Е-экспрессия CD124+ фолликулярным эпителием, коллоидом у пациента с коллоидным зобом. Увеличение 70.</p>

Рисунок 10 - Варианты экспрессии CD124+ в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г, Д) и коллоидном пролиферирующем зобе (Е).

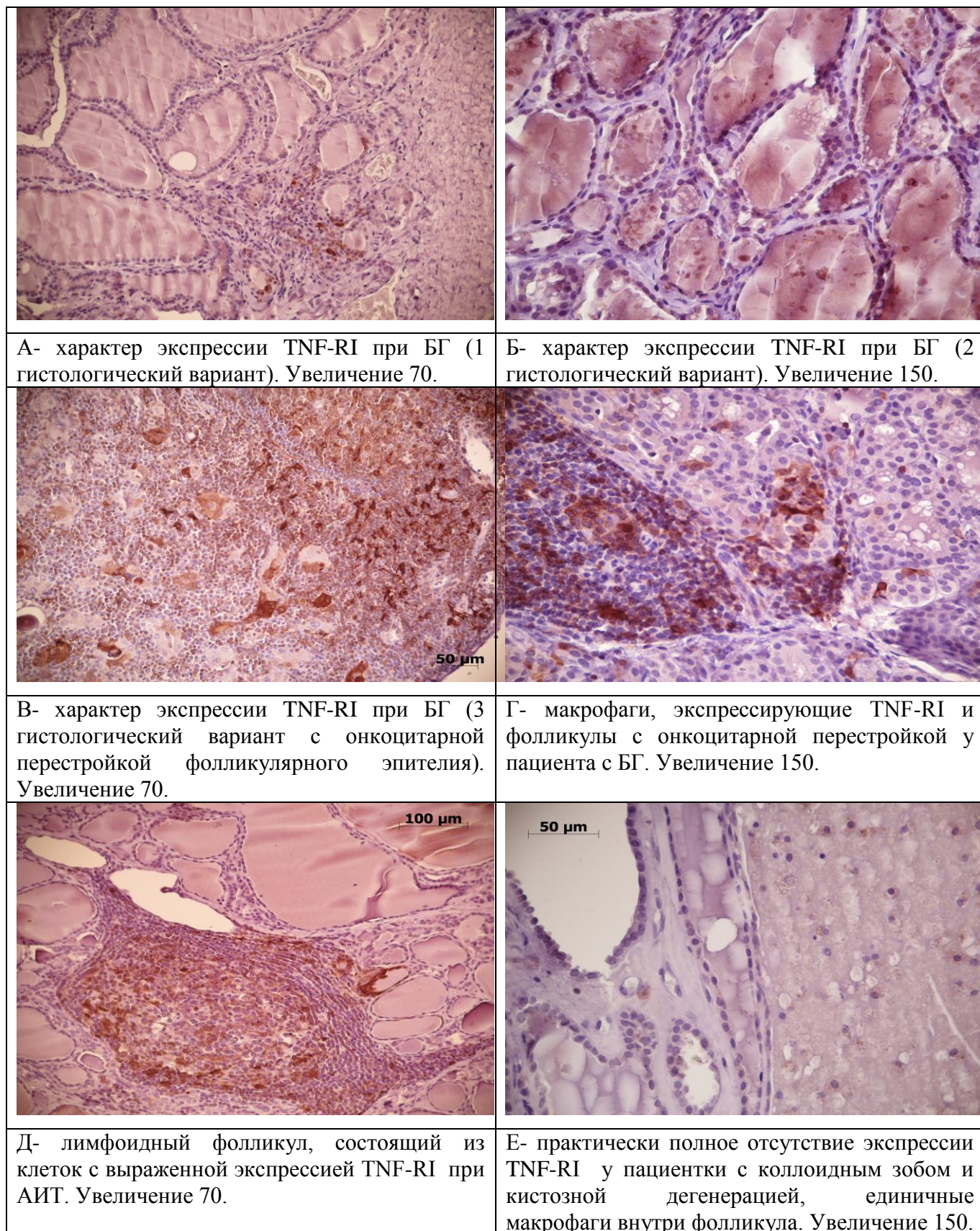


Рисунок 11 - Варианты экспрессии TNF-RI в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г, Д) и коллоидном пролиферирующем зобе (Е).

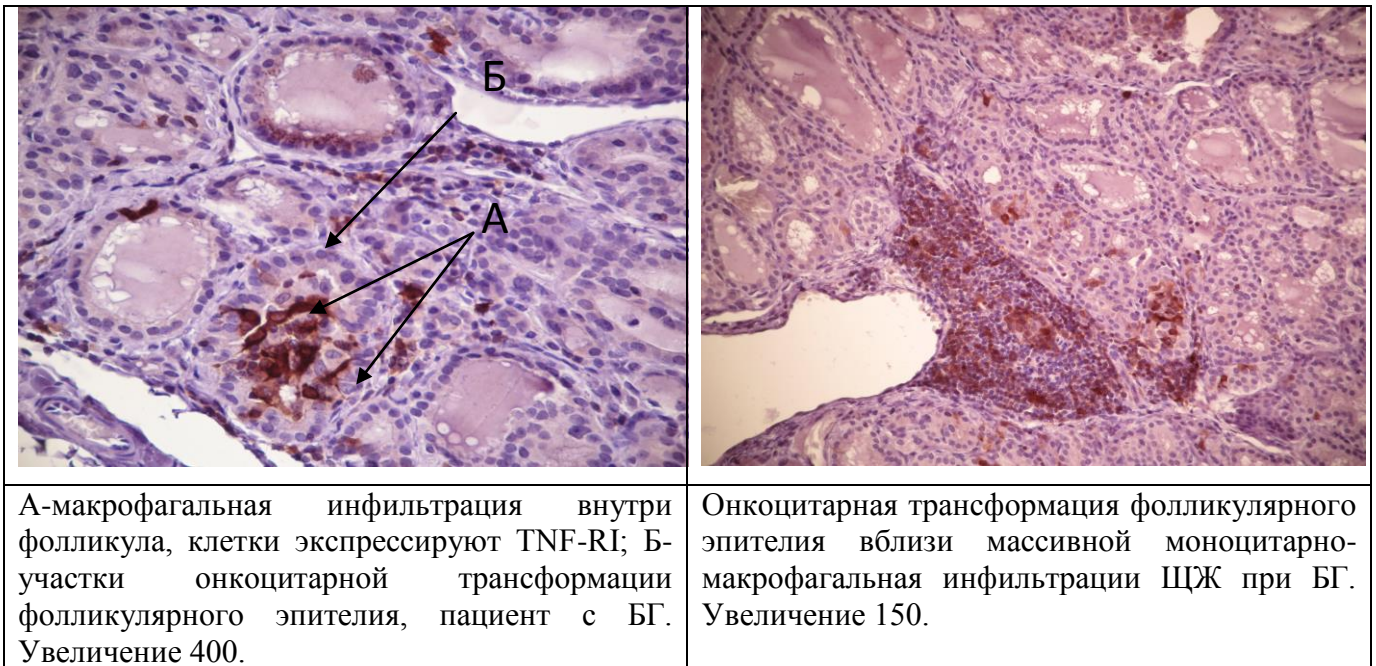


Рисунок 12 - Взаимосвязь экспрессии TNF-RI на инфильтрирующих паренхиму ЩЖ мононуклеарных лейкоцитах и онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия ЩЖ при АИТП.

Иммунологические и морфологические предикторы клинической гетерогенности пациентов с болезнью Грейвса (по результатам исследования оперативного материала щитовидной железы)

С точки зрения морфологического анализа диагноз АИТ верифицирован когда обнаруживается три признака: лимфоплазмоцитарная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов с герминативными центрами, фиброз и оксифильная метаплазия фолликулярного эпителия. Одним из основных признаков АИТ является онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия. Впервые термин «онкоциты» предложил немецкий патолог Hamperl (1931).

Как было выше описано, у пациентов с рассматриваемыми аутоиммунными эндокринопатиями наиболее заметные изменения продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF- α и отклонения в уровне презентации мембран-ассоциированных рецепторов к указанным цитокинам на циркулирующих лимфоцитах крови наблюдаются в условиях выраженных гормонально-метаболических нарушений: при появлении микроангиопатий у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета, а также при гипо- и гипертиреоидном состояниях у больных аутоиммунными тиреопатиями.

Участие цитокинов в аутоиммунных реакциях несомненно, так как презентация антигена антиген-презентирующими клетками (АПК), функционирование Т- и В-лимфоцитов обязательно сопровождается продукцией различных цитокинов, определенным образом влияющих на клетки-мишени. Кроме иммуномодулирующего эффекта, цитокины способны регулировать пролиферацию, процессы апоптоза фолликулярного эпителия, а также изменять функциональную активность тиреоцитов, оказывать прямое воздействие на гормональную активность тиреоидных клеток, стимулировать лимфоидную инфильтрацию щитовидной железы (Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002), а значит

влиять на клиническое течение заболеваний. В частности, поддержание воспаления в ЩЖ либо его разрешение, зависит от баланса про- и противовоспалительных цитокинов и их рецепторов, в частности, TNF- α , IL-2, IL-4 (Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002).

Анализ морфофункциональных взаимосвязей при АИТП проводился в 2 этапа: описание гистологических препаратов ЩЖ и затем анализ иммуногистохимического окрашивания препарата для идентификации рецепторов IL-2R, IL-4R и TNF-RI в ЩЖ при АИТП.

Гистологические изменения при АИТ включали: сплошная лимфоплазмочитарная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов (при диффузной форме иногда с почти полной утратой фолликулов из тироцитов); проявления регенераторного роста (небольшие островки светлых клеток с микрофолликулами, пласты базофильных клеток без образования фолликулов, очаги гиперплазии из клеток Ашкенази, формирующие фолликулы и даже сосочковые фигуры), различной степени выраженности процессы фиброзирования стромы. При оценке гистологического строения ткани ЩЖ при БГ учитывали, что выделяют при данном заболевании 3 гистологических варианта (Пругло М.Ю., 2000; Хмельницкий О.К., 2002):

-Первый (классический) – пролиферативные явления со стороны тироидного эпителия, который образует сосочкообразные выросты в просвет фолликулов, отчего последние принимают звездчатый вид;

-Второй – гиперплазия тироидного эпителия в виде появления мелких фолликулов с низким цилиндрическим эпителием с резорбцией коллоида или с полным его отсутствием, отсутствие лимфоидной инфильтрации;

-Третий – с усиленной пролиферацией тироидного эпителия, эпителий кубический, лимфоидная инфильтрация сочетается с трансформацией тироидного эпителия в клетки Ашкенази (онкоцитарная трансформация). В нашей выборке наиболее часто встречался 2 гистологический вариант – 50%, классический – в 25% случаев и третий – в 9% случаев. В 16% у пациентов с БГ наблюдалось сочетание 2 и 3 гистологических вариантов. Пациентов с 3-м гистологическим вариантом строения ЩЖ и сочетанием 3-го варианта и 2-го варианта объединили в одну группу (n=5) ввиду отсутствия достоверных межгрупповых отличий в значениях изучаемых показателей ($p > 0,05$).

При сопоставлении клинко-инструментальных данных пациентов с БГ с вариантом гистологического строения ЩЖ отмечено преобладание классического варианта с формированием «псевдососочков» и «подушек сандерсена» у пациентов с БГ с большим объемом щитовидной железы по данным ультразвукового исследования: медиана объема ЩЖ у пациентов с 1 гистологическим вариантом составила 55,3[42-64] мл, со вторым вариантом – 32,0[18,3-36,9] мл, с 3-м и смешанным (2-м и 3-м) регистрировались самые низкие показатели объема ЩЖ – 24,0[14,2-28,3] мл ($p < 0,05$). Однонаправленные результаты были получены и при анализе гормональных показателей - уровень ТТГ был минимальным у пациентов с первым, классическим вариантом гистологического строения ЩЖ – 0,01[0,01-0,01] мМЕ/л по сравнению с 0,02[0,01-0,04] мМЕ/л при 2-м варианте и 0,05[0,03-0,06] мМЕ/л – при 3-м варианте ($p = 0,02$),

что также отражает факт сопряженности пролиферативных процессов при БГ с выраженностью гипертиреоза.

Уровень специфических для БГ ауто-антител (АТ-рТТГ) при классическом гистологическом варианте был выше (49,8[34,6-57,5] мМЕ/мл), чем при втором (33,7[24,2-38,4] мМЕ/мл) и третьем (17,9[8,0-20,0] мМЕ/мл) гистологических вариантах, а уровень АТ-ТПО, наоборот возрастал от 1-го к 3-му варианту: у пациентов с 1-м типом составлял 397,4 [31,9-762,0] МЕ/л, со 2-м – 541,7 [273,3-806,5] МЕ/л и с 3-им - 990,1[824,2-1156,0 МЕ/л] соответственно. Данный факт подтверждает предположение, что при клиническом диагнозе БГ не исключено сочетание двух аутоиммунных заболеваний - АИТ и БГ одновременно, в ткани железы происходит взаимодействие иммунологических процессов, проявляющихся в морфофункциональных реакциях ткани, которые подчас носят полярный, взаимно уравнивающий характер: при меньшей выраженности АИТ происходит более выраженная базедофикация ткани, проявляющаяся выраженной экстра- и интрафолликулярной гиперплазией фолликулярного эпителия, увеличением объема ЩЖ и выраженным синдромом гипертиреоза; при большей выраженности АИТ, наоборот, отмечается только экстрафолликулярный тип гиперплазии, меньшая степень зобной трансформации, менее выражена тяжесть гипертиреоза. Данные клинико-морфологические параллели подтверждают наблюдения клиницистов, о том, что сочетание АИТ и БГ более благоприятно в плане тяжести проявлений и возможности стойкой медикаментозной и спонтанной ремиссии аутоиммунного гипертиреоза.

Также было отмечено, что медиана возраста пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами, существенно различается: пациенты с БГ и классическим для БГ гистологическим вариантом перестройки паренхимы значимо моложе (26[24-36] лет, $p < 0,05$), чем пациенты со 2-м гистологическим вариантом БГ – 49[37-53] года, при БГ с 3-м гистологическим вариантом возраст пациентов был наибольшим – 53[46-55] лет. Данная клиническая особенность согласуется с известным фактом преобладания «чистых» классических вариантов БГ среди лиц молодого возраста и накоплением заболеваемости АИТ с исходом в стойкий гипотиреоз с возрастом.

Медиана стажа заболевания у пациентов с 1 гистологическим вариантом БГ составила 2 года [0,8-2,5 года], а со вторым – 4 года [0,5-8,0 лет] и 3-м – также 4 года [2,2-6,5 лет], что также косвенно отражает тяжесть заболевания, выраженность синдрома тиреотоксикоза, что явилось показанием для радикального хирургического лечения аутоиммунного тиреотоксикоза. Современные клинические рекомендации указывают на необходимость радикального излечения БГ (оперативное лечение или радиоiodтерапия) после 1,5-2 лет тиреостатической терапии, если стойкая ремиссия заболевания не была достигнута. Поэтому обращает на себя внимание большой стаж БГ (максимально - 10 лет) у некоторых пациентов, прежде чем они были подвергнуты оперативному лечению.

Нашими данными показано, что подавляющее большинство пациентов с длительным, «доброкачественным» течением БГ, не подвергнутых оперативному лечению в регламентированные сроки, это пациенты с БГ, имеющие 2-й и 3-й

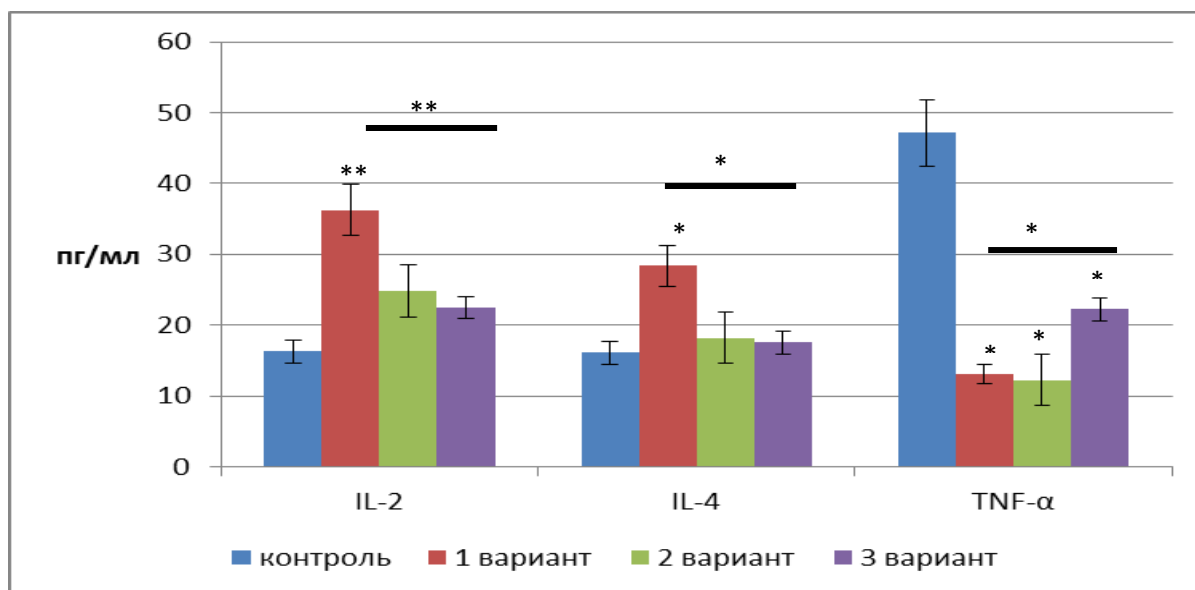
гистологические варианты заболевания. Узловые образования фиксировались с одинаковой частотой при всех гистологических вариантах БГ ($p > 0,05$).

При анализе цитокин-продуцирующей активности культур мононуклеарных лейкоцитов зарегистрирован относительно высокий уровень секреции IL-2 и IL-4 при 1-м гистологическом варианте («классический» тип течения БГ), что отражает взаимосвязь функциональной активности иммуноцитов с клинико-морфологическими проявлениями заболевания (Рисунок 13), т.к. многими исследователями фиксировался факт сопряженности гиперцитокинемии (IL-2, IL-4) с выраженностью гипертиреоза и объемом зоба при БГ (Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В. и др., 2008). Количество экспрессирующих комплементарные цитокинам рецепторы лимфоцитов превышало контрольные значения только при 1-м варианте БГ и касалось лейкоцитов, экспрессирующих CD124+ (Рисунок 13Б).

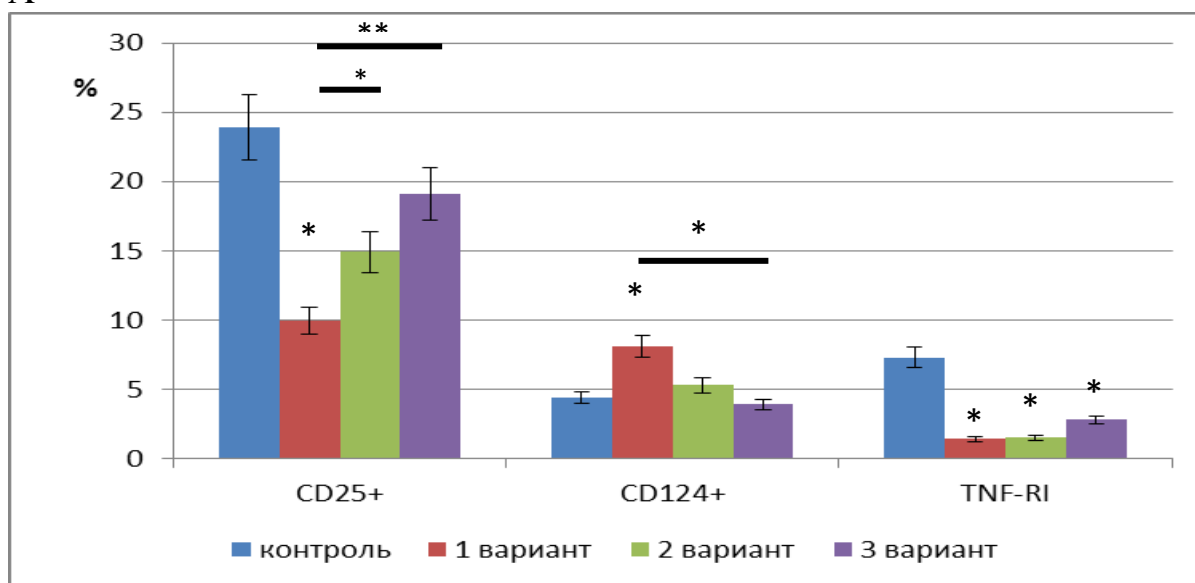
Как было показано выше, при АИТ и БГ имеет место супрессия системы «лиганд-рецептор» TNF- α . Тем не менее, относительно высокие концентрации TNF- α регистрировалась в подгруппе пациентов с 3-м гистологическим вариантом БГ (Рисунок 13А), так же как и количество экспрессирующих TNF-R1 лейкоцитов было максимальным в подгруппе больных БГ с 3-м вариантом строения ткани (Рисунок 13Б), при котором развивалась онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия. Эти изменения в цитокин-секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов сопряжены с изменением фенотипа заболевания: старшая возрастная группа, относительно высокий титр АТ к ТПО и низкий - АТ к рТТГ, меньший объем железы, по сравнению с пациентами с 1-м гистологическим вариантом перестройки паренхимы ЩЖ. Согласно некоторым исследованиям, уровень апоптоза лимфоцитов при БГ не повышается, в отличие от АИТ, что может свидетельствовать о пролиферативной направленности патологических процессов при БГ на фоне выраженного аутоиммунного воспаления, реализуемого через механизмы аутоантителопродукции (Дрометр, Д. А., 2009). Этот факт можно рассматривать и как следствие уменьшения количества TNF-R1 – презентующих лимфоцитов, что и было обнаружено нами в ходе проведенного исследования (Рисунок 13Б).

Известно, что TNF- α играет важную роль в развитии АИТП, и в частности, БГ. TNF- α , являясь провоспалительным цитокином, активирует лимфоциты, регулирует их апоптоз и процессы межклеточной коммуникации иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления, при БГ TNF- α усиливает абберантную экспрессию молекул адгезии и HLA II класса на поверхности тиреоцитов, что может способствовать запуску аутоиммунных процессов в ЩЖ (Vučanović NL., 2011). Многими авторами показано, что продукция TNF- α лимфоцитами крови больных с БГ была близка к нормальной и возрастала на фоне терапии радиоактивным йодом, а также сывороточная концентрация TNF- α не была увеличена (Jones, B., 1999). В некоторых исследованиях было обнаружено, что уровни TNF- α мРНК в ткани ЩЖ у больных с БГ были ниже, чем у пациентов с АИТ. По мнению исследователей, дефицит интратиреоидной продукции TNF- α у пациентов с рецидивом БГ соответствует дефициту продукции TNF- α клонами Т-лимфоцитов, изолированных от ЩЖ (Salvi M., 2000). Таким образом, результатами

нашего исследования были дополнены существующие данные о преобладании эффектов TNF при интратиреоидном воспалении с паттернами, характерными для АИТ (преобладание АТ к ТПО), нежели БГ, а также «смягчении» клинического течения при активации супрессированной при БГ системы TNF- α .



А



Б

Рисунок 13 - Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов крови (А) и количество лейкоцитов, несущих комплементарные рецепторы (Б) у пациентов с различными гистологическими вариантами болезни Грейвса.

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ в сравнении со значениями группы контроля, сравнения

Общие закономерности и особенности цитокиноопосредованных механизмов дизрегуляции иммунной системы при эндокринопатиях с различной локализацией аутоиммунного процесса (методы многомерного анализа)

Для выявления комплекса наиболее информативных показателей, ассоциированных с развитием аутоиммунного повреждения щитовидной и поджелудочной желез, нами был проведен дискриминантный анализ данных. В случае определения в качестве группирующего признака «аутоиммунный сахарный диабет» было обосновано, что наибольший вклад в значение дискриминантной функции, разделяющей группы здоровых лиц и больных СД, вносит показатель продукции моноклеарными лейкоцитами крови ИЛ-2. Помимо этого, в дискриминантное уравнение вошли показатели концентрации TNF- α и количества Th-лимфоцитов в крови (Таблица 9).

Таблица 9 - Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции

группирующий признак – сахарный диабет		группирующий признак – тиреопатии	
Показатель	Коэффициент	Показатель	Коэффициент
ИЛ-2	1,027	CD16⁺CD56^{low}-лимфоциты	1,193
TNF α	-0,411	CD3⁺-лимфоциты	0,547
CD4 ⁺ -лимфоциты	0,355	TNFα	0,509
		ИЛ-2	-0,322
		ИЛ-4	-0,270
		CD19 ⁺ -лимфоциты	-0,239
		CD8 ⁺ -лимфоциты	0,148
		CD4 ⁺ -лимфоциты	-0,029

Каноническое дискриминантное уравнение имело вид:

$$d = -3,233 + 0,025 * \text{ИЛ-2} - 0,003 * \text{TNF}\alpha + 0,052 * \text{CD4}^+\text{-клетки}$$

Результаты классификации, рассчитанные по обучающей выборке, показали, что относительная частота принятия безошибочных решений, как по отношению к истинно больным, так и истинно здоровым, составляет 88,8 %, чувствительность – 75 % и специфичность – 100 %.

Аналогичным образом, при использовании в качестве группирующего признака «аутоиммунные тиреопатии» в дискриминантное уравнение были включены значения таких переменных, как количество CD16⁺CD56^{low}-лимфоцитов, CD3⁺-лимфоцитов, CD4⁺-, CD8⁺- и CD19⁺-клеток, а также концентрации в культуре моноклеарных лейкоцитов крови ИЛ-2, ИЛ-4 и TNF- α (Таблица 9).

Каноническое дискриминантное уравнение, полученное при решении классификационной задачи, имело вид: $d = -8,687 + 0,211 * \text{NK-лимфоциты} + 0,08 * \text{CD3}^+ + 0,004 * \text{TNF-}\alpha - 0,006 * \text{ИЛ-2} - 0,012 * \text{ИЛ-4} - 0,061 * \text{CD19}^+ + 0,024 * \text{CD8}^+ - 0,004 * \text{CD4}^+$.

Результаты классификации здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными тиреопатиями, полученные в данной модели, показали, что относительная частота

принятия безошибочных решений, как по отношению к истинно больным, так и истинно здоровым составляет 70,3%, чувствительность – 73% и специфичность – 67%.

Таким образом, подтверждено, что концентрации цитокинов IL-2 и TNF- α при аутоиммунном СД, а также IL-2, IL-4 и TNF- α при аутоиммунных тиреопатиях являются значимыми дискриминантными характеристиками аутоиммунного повреждения поджелудочной и щитовидной желез.

На втором этапе многомерного анализа нами была поставлена задача определения наиболее информативных признаков, ассоциированных с двумя различными вариантами аутоиммунного сахарного диабета – с манифестным началом и медленно прогрессирующим сахарным диабетом взрослых (LADA).

Однако, при включении в модель только иммунологических маркеров (субпопуляционный состав лимфоцитов, продукция интерлейкинов и количество клеток с экспрессией комплементарных им рецепторов) удовлетворительных классификационных функций построено не было. Отсутствие однозначного набора иммунологических признаков, разделяющих два варианта аутоиммунного сахарного диабета (LADA и СД 1 типа с манифестным началом) свидетельствует об отсутствии резко выраженных отличий в иммунопатогенезе. Поэтому на данном этапе произошла смена цели многомерного анализа – от выделения кластера иммунологических маркеров, определяющих специфические черты иммунопатогенеза, на прикладную клиническую цель – выделение признаков, определяющих особенности клинической манифестации двух субвариантов аутоиммунного СД (латентного аутоиммунного сахарного диабета взрослых-LADA и СД тип 1 с манифестным началом), и уже на втором этапе – увеличение чувствительности и специфичности модели с помощью иммунологических параметров. Такие модели имеют прикладное значение с целью усовершенствования диагностики того или иного состояния/заболевания для применения в клинической практике.

Таким образом, в информативную дискриминантную модель были включены 4 параметра: возраст пациента на момент дебюта СД, возраст пациента на момент обследования, окружность талии и концентрация IL-10 в супернатантах культуральных сред нестимулированных мононуклеарных лейкоцитов (Таблица 10). Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции служат для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции, с учетом влияния остальных переменных. Чем больше абсолютное значение коэффициента, тем больше относительный вклад данной переменной в значение дискриминантной функции, разделяющей классы (Таблицы 9,10).

На основании коэффициентов канонической дискриминантной функции было построено каноническое дискриминантное уравнение для дискриминации вариантов аутоиммунного СД (LADA и СД 1 тип манифестного течения):

КЛДФ (d) = - 38,06 + 0,466 * ОТ (см) + 0,081 * возраст пациента (лет) + (-0,179)* возраст дебюта СД (лет) + 0,004* IL-10 баз. концентрация.

Чувствительность дискриминантной модели для выделения клинических вариантов течения СД 1 - 100%, специфичность – 100,0%. Безошибочность -

96,0%. Ложноотрицательный ответ (ошибка первого рода) - 0,0%. Ложноположительный ответ (ошибка второго рода) - 0,0%. Таким образом, была получена качественное уравнение дискриминации двух вариантов аутоиммунного сахарного диабета с набором уже известных клинических признаков, таких как возраст пациента и возраст, в котором СД манифестировал, окружности талии и только одного иммунологического параметра – концентрации IL-10 в супернатантах нестимулированных мононуклеарных лейкоцитов.

Таблица 10 - Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции

группирующий признак – аутоиммунный сахарный диабет		группирующий признак – аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса	
Показатель	Коэффициент	Показатель	Коэффициент
Возраст пациента, лет	0,692	CD16+ CD56+	0,227
Окружность талии (ОТ), см	4,479	TNF-α, баз. концентрация, пг/мл	0,759
возраст дебюта СД, лет	-1,504	IL-2, баз. концентрация, пг/мл	0,415
Концентрация IL-10 баз., пг/мл	5,531		

Аналогичный подход к обработке массива клинических, гормональных и иммунологических данных использовался для выделения наиболее важных с точки зрения дальнейшего изучения и использования в качестве иммунологических маркеров аутоиммунного тиреоидита и болезни Грейвса. Лучшей по количеству правильно классифицированных объектов из предложенных иммунологических маркеров стала модель, в которой наиболее значимыми оказались: количество НК-клеток (CD15+CD56^{low}), концентрация IL-2 и TNF-α в культуральной среде нестимулированных мононуклеарных лейкоцитов (Таблица 10). Характеристики полученной математической модели: относительная частота принятия безошибочных решений (по отношению к истинно больным и истинно здоровым) –78,8%, чувствительность – 100%, специфичность – 63,2%, уровень статистической значимости (p)=0,02.

Каноническое дискриминантное уравнение: КЛДФ (d) = - 1,419 + 0,037 * CD16+ CD56^{low} (%) + 0,007 * TNF-α баз. концентрация (пг/мл) + 0,008* IL-2 баз. концентрация (пг/мл).

ВЫВОДЫ

1. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови при эндокринопатиях аутоиммунного генеза имеет общие (увеличение абсолютного количества CD3+-лимфоцитов, уменьшение CD16+CD56+low-клеток) и специфические для каждой нозологии изменения:
 - при аутоиммунных вариантах сахарного диабета (сахарный диабет 1 типа и латентный аутоиммунный диабет взрослых) уменьшение абсолютного количества CD8+-лимфоцитов по сравнению со значениями данного показателя у больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых доноров; у пациентов с латентным аутоиммунным диабетом взрослых снижено абсолютное количество CD19+-лимфоцитов относительно значений у пациентов с сахарным диабетом 1 типа;
 - аутоиммунный тиреоидит сопровождается увеличением абсолютного количества CD4+- и CD8+-клеток, независящим от функционального состояния щитовидной железы (гипотиреоз, эутиреоз); болезнь Грейвса характеризуется увеличением количества данных субпопуляций клеток только в фазе гипертиреоза, что отражает влияние тиреоидных гормонов на процессы активации лимфоцитов.
2. Латентный аутоиммунный сахарный диабет характеризуется преобладанием среди серологических маркеров заболевания антител к ICA (71%) и GAD (39%), высокой частотой ассоциации с аутоиммунным тиреоидитом (32%), снижением базальной и стимулированной секреции С-пептида после 4-го года заболевания, а также корреляционной зависимостью между титром антител к ICA с высокой скоростью снижения эндогенной секреции инсулина.
3. Латентный аутоиммунный сахарный диабет сопровождается изменением параметров иммунной системы, которые могут обуславливать медленные темпы развития инсулиновой недостаточности по сравнению с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения: повышение концентраций IL-4 и IL-10 в кондиционных средах культур мононуклеарных лейкоцитов, увеличение количества IL-4R+ -несущих лимфоцитов; дисбаланс в системе цитокинов-регуляторов апоптоза (увеличение количества TNF-RI+- и FasL+-лимфоцитов и повышение содержания sTNF-RI в кондиционных средах культур мононуклеарных лейкоцитов).
4. У пациентов с латентным сахарным диабетом взрослых диабетические микроангиопатии развиваются раньше (медиана - 4 года), чем у пациентов с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения (медиана - 8 лет). Патогенез диабетических микроангиопатий при латентном сахарном диабете взрослых сопряжен с сочетанием метаболических (продолжительное снижение базальной концентрации С-пептида) и иммунологических изменений (повышение секреции *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF- α и увеличение количества лимфоцитов, презентующих комплементарные им рецепторы), определяющих темпы формирования и клиническую выраженность эндотелиальной дисфункции.

5. Признаком дисбаланса системы цитокинов при аутоиммунных тиреопатиях являются увеличение количества CD124⁺-лимфоцитов при отсутствии изменения секреции IL-4, а также угнетение компонентов системы «лиганд-рецептор» TNF- α . Содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов снижено при гипотиреозе, повышено - при гипертиреозе, что отражает влияние тиреоидных гормонов на степень активации Th-лимфоцитов. Для пациентов с болезнью Грейвса характерно уменьшение количества CD25⁺-лимфоцитов, как в фазе гипертиреоза, так и в фазе медикаментозно индуцированного эутиреоза.
6. IL-2-секретирующая функция мононуклеарных лейкоцитов сопряжена с изменением концентрации тиреоидных гормонов у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (снижается при гипотиреозе и повышается при гипертиреозе) и не зависит от нозологического варианта аутоиммунного заболевания щитовидной железы, а при сахарном диабете – с выраженностью гипергликемии (повышается при декомпенсации углеводного обмена).
7. Инфильтрирующие паренхиму щитовидной железы иммунокомпетентные клетки экспрессируют три вида рецепторов цитокинов (TNF-RI, IL-2R, IL-4R), в то время как фолликулярным эпителием – только рецепторы к IL-2 и IL-4 (IL-2R, IL-4R). Увеличение экспрессии IL-2R клетками фолликулярного эпителия щитовидной железы сопряжено с выраженностью пролиферативных процессов в щитовидной железе независимо от варианта аутоиммунного заболевания.
8. Увеличение экспрессии TNF-RI мононуклеарными лейкоцитами, инфильтрирующими ткань щитовидной железы, сопряжено с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия, что связывает эффекты TNF- α и структурно-функциональные изменения в щитовидной железе при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса.
9. Первый гистологический вариант перестройки паренхимы щитовидной железы при болезни Грейвса сопряжен с изменениями баланса цитокинов Th1/Th2-профиля (сочетание повышенной секреции IL-2 и IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*, увеличение количества CD124⁺-лимфоцитов и уменьшение количества CD25⁺-лимфоцитов) и фенотипа клинического течения заболевания: молодой возраст пациентов (26[24-36] лет), большой объем щитовидной железы (55,3[42-64] мл), выраженный синдром гипертиреоза (уровень ТТГ 0,01[0,01-0,01] мМЕ/л), выраженная продуктивная фаза аутоиммунного воспаления с преимущественной продукцией антител к рецептору ТТГ (49,8[34,6-57,5] мМЕ/мл) и относительно низким титром антител к ТПО (397,4[31,9-762,0] МЕ/л) по сравнению со вторым и третьим гистологическими вариантами болезни Грейвса.
10. У пациентов с болезнью Грейвса степень супрессии системы «лиганд-рецептор» TNF- α наиболее значима при первом гистологическом варианте перестройки паренхимы, наименее – при третьем (появление онкоцитарной трансформации тиреоидного эпителия). Активация системы данного

цитокина ассоциирована с клиническим фенотипом течения болезни Грейвса, характеризующимся: старший возраст пациентов (53[46-55] года), меньший объем железы (24,0[14,2-28,3] мл), меньшая выраженность синдрома гипертиреоза (ТТГ 0,05[0,03-0,06] мМЕ/л), большей степенью повышения титра АТ к ТПО (990,1[824,2-1156,0] МЕ/л) и меньшей - антител к рецептору ТТГ (17,9 [8,0-20,0] мМЕ/мл) по сравнению с первым вариантом перестройки паренхимы. Данный клинический фенотип сопровождается затягиванием медикаментозного этапа лечения пациентов с болезнью Грейвса (свыше 1,5 лет).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выделения больных латентным сахарным диабетом взрослых среди пациентов с гормонально-метаболическим фенотипом сахарного диабета типа 2 целесообразно одновременно определять в сыворотке крови два типа аутоантител (к ICA и GAD), а также использовать комплекс иммунологических параметров (уровень продукции IL-2, TNF- α мононуклеарными лейкоцитами, количество циркулирующих CD4⁺-лимфоцитов).
2. Пациентам с сахарным диабетом и повышенным титром антител к ICA следует проводить мониторинг концентрации С-пептида натощак, особенно у больных с длительностью заболевания более 4-х лет. Данной категории пациентов целесообразно раннее назначение инсулинотерапии.
3. Высокая частота ассоциации латентного аутоиммунного сахарного диабета взрослых и аутоиммунного тиреоидита требует проведения у пациентов с данным заболеванием регулярного скрининга, включающего ультразвуковое исследование щитовидной железы, определение в сыворотке крови уровня тиреотропного гормона (ТТГ) и антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО).
4. Применение метода многофакторного дискриминантного анализа с учетом наиболее значимых показателей клинического фенотипа, а также иммунологических параметров, позволяет относить больных в группы с эндокринопатиями аутоиммунного генеза:
 - пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом (секреция IL-2, TNF- α мононуклеарными лейкоцитами и количество CD4⁺-лимфоцитов);
 - пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (количество CD16+CD56^{low}-лимфоцитов, количество CD3⁺-лимфоцитов, а также TNF- α -секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов);
 а также дифференцировать между отдельными вариантами аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунными тиреопатиями:
 - пациентов с латентным аутоиммунным диабетом от пациентов с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения (возраст пациента и возраст дебюта заболевания, окружность талии, концентрация IL-10 в культуре мононуклеарных лейкоцитов);
 - пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса (количество CD16+CD56^{low}-лимфоцитов, TNF- α - и IL-2-секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Показатели базальной и ФГА-стимулированной продукции интерлейкинов 2 и 4 мононуклеарами при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии: материалы научной конференции, г. Томск, 22-23 октября 2009. – Томск, 2009. – С. 211-213.
2. Клинический полиморфизм дебюта сахарного диабета 1 типа у детей и подростков – диагностические ошибки / Т.В. Саприна, А.А. Васильева // Науки о человеке: материалы X международного конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2009. – С.46-48.
3. Система фактора некроза опухолей α в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, Ф.Э. Лазаренко, Н.В.Рязанцева // Сб. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине»: материалы I межд. научно-практической конференции.- СПб: изд-во политехнического университета, 2010.- С. 86-87.
4. Роль TNF и IL-10 в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко // Актуальные вопросы эндокринологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 18–19 ноября 2010 г. – С. 32-33.
5. Роль Th1/Th2-поляризации иммунного ответа в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева // Актуальные проблемы медицины: материалы конференции с международным участием, г. Абакан, 4-5 мая 2010 г. – С. 368-371.
6. Особенности спонтанной и ФГА-стимулированной продукции интерлейкины-2 и -4 мононуклеарами крови при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко // Сборник «V Всероссийский диабетологический конгресс»: материалы конгресса. – Москва, 2010.-С. 87-88.
7. Значение Th1/Th2 поляризации иммунного ответа при формировании клинического фенотипа сахарного диабета / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко // Актуальные вопросы эндокринологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 18–19 ноября 2010 г. – С. 22.
8. Продукция интерферона γ и состояние его рецепторного аппарата при сахарном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко // Актуальные вопросы эндокринологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 18–19 ноября 2010 г. – С. 38-39.
9. Особенности поражения сердечно-сосудистой системы при аутоиммунном тиреоидите / В.Н. Латыпова, Е.М. Идрисова, Даваасурен Дамдиндорж, Т.В. Саприна, В.А. Столярова, Ю.А.Ткачук // Актуальные вопросы эндокринологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 18–19 ноября 2010 г. – С. 57-58.
10. Дисбаланс Th1/Th2 – иммунного ответа при аутоиммунном сахарном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2010. -№ 10. - С. 76-78.
11. Роль цитокинов в патогенезе аутоиммунного диабета, вопросы иммуоинтервенции / Е.Б. Кравец, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2010. – № 1. – С. 76-83. ИФ РИНЦ 0,331.

12. Гетерогенность сахарного диабета с позиции Th1/Th2-дисбаланса иммунного ответа / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы межгородской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2010 г. – С. 148-150.
13. Особенности базальной и стимулированной секреции интерлейкинов 2 и 4 мононуклеарами крови при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, В.А. Столярова, Н.В. Рязанцева // **Сибирский медицинский журнал.** – 2010. – № 1. – С.41-44. ИФ РИНЦ 0,106.
14. Цитокиноопосредованные механизмы детерминации клинического фенотипа аутоиммунного диабета / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко // Материалы XI конгресса молодых ученых и специалистов, г. Томск, 27-28 мая 2010 г. – С.15-17.
15. Цитокиноопосредованные механизмы формирования аутоиммунных тиреопатий / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Клиническая экспериментальная тиреоидология.** – 2010. – № 4. – С. 22-27. ИФ РИНЦ 0,208.
16. Участие системы фактора некроза опухолей α в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.М. Резцова, К.О. Завгородская // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля 2011 г. – С. 228-230.
17. Молекулярно-генетические механизмы дизрегуляции системы цитокинов и их рецепторов при социально значимых заболеваниях инфекционного и неинфекционного генеза / А.П. Зима, Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Дни иммунологии в Сибири: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля 2011 г. – С. 54-55.
18. Анализ функционального состояния сосудистого эндотелия при аутоиммунном тиреоидите / В.Н. Латыпова, Е.М. Идрисова, Даваасурен Дамдиндорж, Т.В. Саприна // Актуальные вопросы эндокринологии: материалы II Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием.- Томск, 2011.- С. 36-37.
19. Система фактора некроза опухолей α в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, И.Н. Ворожцова // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – №.1 – С. 64-69. ИФ РИНЦ 0,331.
20. Роль Th1/Th2 дисбаланса иммунного ответа в детерминации клинических особенностей аутоиммунного сахарного диабета взрослых / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Сахарный диабет.** – 2011. – № 2. – С. 12-17. ИФ РИНЦ 0,812.
21. Роль интерлейкина-2 и интерлейкина-4 и их рецепторов в иммуноопосредованных механизмах развития аутоиммунного тиреоидита / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, И.Н. Ворожцова и др. // **Сибирский медицинский журнал.** – 2011. Т. 26. – № 4. – С. 186-189. ИФ РИНЦ 0,106.
22. Особенности продукции и рецепции интерлейкина-2 мононуклеарными лейкоцитами крови при аутоиммунном сахарном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // **Сибирский медицинский журнал.** – 2011. – Т. 26, № 4. – С. 65-70. ИФ РИНЦ 0,106.
23. Анализ эндотелиальной дисфункции пациентов с аутоиммунным тиреоидитом в зависимости от функционального стояния щитовидной железы / В.Н. Латыпова,

- Т.В. Саприна, Д. Дамдиндорж, Е.М. Идрисова, И.Н. Ворожцова // **Сибирский медицинский журнал**.-2011.- Т. 26.-4(2).- С. 172-176. ИФ РИНЦ 0,106.
24. Status of cytokines and their receptors in the genesis of autoimmune endocrinopathy / T.V. Saprina, T.S. Prokhorenko, A.P. Zima, N.V. Ryazantseva, V.V. Novitsky // II International Scientific Conference "Future development of Science and Technology - 2011", Przemysl, 7-15 nov. 2011. – P.66-68.
 25. Особенности продукции и рецепции цитокинов Th1/Th2-профиля при болезни Грейвса / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, В.М. Резцова, А.П. Зима, С.Ю. Мартынова, Н.В. и др. // **Клиническая и экспериментальная тиреоидология**. – 2012. – №2. – С. 43-49. ИФ РИНЦ 0,208.
 26. Особенности продукции цитокинов Th1/Th2-профиля у пациентов с различными клиническими вариантами аутоиммунного сахарного диабета / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Цитокины и воспаление**. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51-57. ИФ РИНЦ 0,506.
 27. Иммуно-метаболические аспекты развития микроангиопатий при латентном аутоиммунном диабете взрослых / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания: современные подходы к диагностике и лечению: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 24-26 октября 2012. – С. 148-150.
 28. Роль системы Fas и Fas-L в иммуноопосредованных механизмах развития медленно прогрессирующего аутоиммунного сахарного диабета у взрослых (LADA) / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, Ф.Э. Лазаренко, А.П. Зима, О.А. Васильева, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук**.- 2012.- Т.32.-№4- С. 59-65. ИФ РИНЦ 0,388.
 29. Особенности продукции и рецепции интерлейкина-2 и интерлейкина-4 при аутоиммунных тиреопатиях / Т.В. Саприна // **Медицинская иммунология**.- 2012.- Т.14.-№4-5.-С.365-372. ИФ РИНЦ 0,553.
 30. Частота носительства аутоантител к островковым клеткам и роль аутоиммунитета в развитии гестационного сахарного диабета / Е.С. Тимохина, Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, И.Н. Ворожцова // **Проблемы репродукции** - 2012.-Т. 18.-№5.-С.107-111. ИФ РИНЦ 0,373.
 31. Проблема диагностики гестационного сахарного диабета по уровню гликированного гемоглобина / Т.В. Саприна, Е.С. Тимохина, И.Н. Ворожцова // **Сахарный диабет**.-2012.-№4.-С.63-68. ИФ РИНЦ 0,812.
 32. Особенности продукции и рецепции цитокинов Th1/Th2 профиля при аутоиммунных тиреопатиях / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, В.М. Резцова, К.О. Завгородская, И.Н. Ворожцова, Н.В. Рязанцева // VI Всероссийский конгресс эндокринологов»: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.-Москва,2012.-С.368.
 33. Дисбаланс системы «лиганд-рецептор» фактора некроза опухолей α и экспрессия TNF-RI в ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, С.Ю. Мартынова, А.Н. Дзюман, А.П. Зима и др. // **Клиническая и экспериментальная тиреоидология**.- 2013.- Т. 9, № 3.- С. 56-65. ИФ РИНЦ 0,208.
 34. Взаимосвязь иммунологических и метаболических факторов в развитии и прогрессировании микроангиопатий при латентном аутоиммунном диабете взрослых (LADA) / Т.В. Саприной, Т.С. Прохоренко, Ф.Э. Лазаренко, И.Н.

Ворожцова, Н.В. Рязанцева // **Бюллетень сибирской медицины.**- 2014.- Т. 13, № 1. - С. 73-78. ИФ РИНЦ 0,331

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИТ – аутоиммунный тиреоидит	CD – кластер дифференцировки
АИТП – аутоиммунные тиреопатии	DCCT – Diabetes Control and Complications Trial
Анти-рТТГ – антитела к рецептору тиреотропного гормона	GAD – декарбоксилаза глутаминовой кислоты
Анти-ТГ – антитела к тиреоглобулину	IAA – антитела к инсулину
Анти-ТПО – антитела к тиреоидной пероксидазе	ICA – антитела к поверхностному антигену β -клетки
Ауто-АТ – ауто-антител	IL – интерлейкин
БГ – болезнь Грейвса	LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых
ИМТ – индекс массы тела	NK – лимфоциты натуральные киллеры
НОЦ – научно-образовательный центр	sTNF-R1 – растворимый рецептор фактора некроза опухолей α первого типа
ОТ- окружность талии	Th –Т-хелпер
СД1 – сахарный диабет 1 типа	TNF- α –фактор некроза опухолей α
СД2 – сахарный диабет 2 типа	
ТТГ – тиреотропный гормон	
ТТСП – тест толерантности к смешанной пище	
ФГА – фитогемагглютинин	
ЩЖ – щитовидная железа	

Подписано в печать 30.09.2014
Усл. печ. листов 1,6. Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08
Заказ № 222 Тираж 100 экземпляров