

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Прохоренко Татьяна Сергеевна

**ЦИТОКИНЫ IL-2, IL-4, TNF α И ИХ РЕЦЕПТОРЫ КАК
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЭНДОКРИНОПАТИЙ
АУТОИММУННОГО ГЕНЕЗА**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор Н.В. Рязанцева;

профессор, академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ
В.В. Новицкий

Томск-2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список использованных сокращений.....	6
Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1 Современные представления об этиологии и патогенезе аутоиммунных эндокринопатий.....	15
1.2 Роль цитокинов и их рецепторов в патогенезе аутоиммунного воспаления.....	27
1.3 Цитокинопосредованные механизмы развития аутоиммунных заболеваний щитовидной и поджелудочной желез.....	36
Глава 2. Материал и методы исследования.....	45
2.1 Общая характеристика обследованных лиц.....	45
2.1.1 Клиническая характеристика пациентов с сахарным диабетом	47
2.1.2 Клиническая характеристика пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	53
2.2 Методы исследования	55
2.2.1 Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови.....	56
2.2.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови.....	58
2.2.3 Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови.....	59
2.2.4 Методы оценки системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α	59
2.2.4.1 Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови.....	59
2.2.4.2 Определение концентрации растворимого рецептора к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови.....	60
2.2.4.3 Определение количества лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-2, IL-4 и TNF α	61

2.2.5 Оценка концентрации органоспецифических антител к поджелудочной и щитовидной железам.....	62
2.2.5.1 Оценка концентрации аутоантител к инсулярному аппарату поджелудочной железы.....	62
2.2.5.2 Оценка концентрации аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы.....	63
2.2.6 Статистический анализ результатов исследования.....	65
Глава 3. Результаты собственных исследований.....	66
3.1 Фенотипическая характеристика лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями.....	66
3.1.1 Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза.....	66
3.1.2 Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	70
3.2 Концентрация аутоантител к поджелудочной и щитовидной железам в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями.....	75
3.2.1 Концентрация органоспецифических антител в сыворотке крови больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза.....	75
3.2.2 Концентрация аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	76
3.3 Состояние системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями	78
3.3.1 Система IL-2, IL-4, TNF α и комплементарных им рецепторов в лимфоцитах крови у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза	78
3.3.1.1 Содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов	

крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза.....	78
3.3.1.2 Содержание IL-4 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза.....	81
3.3.1.3 Содержание TNF α и растворимой формы рецептора к TNF α в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентующих рецептор к TNF α , у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза.....	84
3.3.2 Система IL-2, IL-4, TNF α и комплементарных им рецепторов в лимфоцитах крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями...	88
3.3.2.1 Содержание IL-2 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	88
3.3.2.2 Содержание IL-4 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	90
3.3.2.3 Содержание TNF α и растворимой формы рецептора к TNF α в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентующих рецептор к TNF α , у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	91
3.4 Комплексное сравнение иммунологических параметров у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями.....	95
Глава 4. Обсуждение результатов.....	100
4.1 Роль системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в механизмах развития аутоиммунного сахарного диабета.....	100

4.2 Роль системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в механизмах развития аутоиммунных тиреопатий.....	109
4.3 Общие закономерности и особенности цитокинопосредованных механизмов дизрегуляции иммунной системы при эндокринопатиях аутоиммунного генеза.....	118
Выводы.....	125
Список литературы.....	127

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИТ – аутоиммунный тиреоидит

БГ – болезнь Грейвса

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

рТТГ – рецептор тиреотропного гормона

СД – сахарный диабет

СД1 – сахарный диабет 1 типа

СД2 – сахарный диабет 2 типа

T₃ – трийодтиронин

T₄ – тироксин

ТГ – тиреоглобулин

ТПО – тиреоидная пероксидаза

ТТГ – тиреотропный гормон

ФГА – фитогемагглютинин

ЩЖ – щитовидная железа

CD – (cluster of differentiation) кластер дифференцировки

GAD – (glutamic acid decarboxylase) декарбоксилаза глутаминовой кислоты

HLA – (human leukocyte antigen) антигены тканевой совместимости

IAA – (insulin autoantibody) антитела к инсулину

ICA – (islet-cell antibodies) антитела к поверхностному антигену β-клетки

IFN – (interferon) интерферон

IL – (interleukin) интерлейкин

JAK – (Janus-associated kinase) киназа семейства Janus

JNK – (Jun N-terminal kinase) киназа, фосфорилирующая фактор c-jun

LADA – (latent autoimmune diabetes of adults) латентный аутоиммунный диабет взрослых

MAP – (mitogen-activated protein) митоген-активируемая протеинкиназа

NF-κB – (nuclear factor κB) транскрипционный фактор kappa B

NIS – (Na/I-simporter) натрий-йодный симпортер

NK – (natural killer) лимфоциты натуральные киллеры

NO – оксид азота

SOCS – (suppressor of cytokine signaling) регулятор цитокинового сигнала

sTNF-R1 – (soluble tumor necrosis factor α receptor) растворимый рецептор фактора некроза опухолей α первого типа

TGF β – (transforming growth factor β) трансформирующий фактор роста β

Th – (T-helper) Т-хелпер

TNF α – (tumor necrosis factor α) фактор некроза опухолей α

TNF α R1 – (tumor necrosis factor α receptor) рецептор фактора некроза опухолей α первого типа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Идентификация 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; Stefan M. et al., 2011; Eschler D.C. et al., 2011], а также существенным ухудшением качества жизни пациентов при нарушении функций эндокринных желез [Сарвилина И.В. и соавт., 2007; Заводник И.Б. и соавт., 2011].

Согласно современным представлениям, развитие аутоиммунного сахарного диабета (сахарного диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета взрослых) и аутоиммунных тиреопатий (аутоиммунного тиреоидита и болезни Грейвса) связано с продукцией органоспецифических аутоантител, инфильтрацией железы различными субпопуляциями лимфоцитов и продукцией ими широкого спектра цитокинов [Кандрор В.И., 2006, 2008; Pugliese A., 2010; Maruyama T. et al., 2011; Li H., Wang T., 2013].

Цитокинам принадлежит особая роль в индукции и поддержании аутоиммунного воспаления. Они способны регулировать миграцию иммунных клеток в очаг воспаления, процессы пролиферации и апоптоза иммунокомпетентных клеток и клеток эндокринных желез, а, следовательно, влиять на функциональную активность гормон-продуцирующих клеток и клиническое течение заболевания [Weetman A.P., 2004; Дедов И.И. и соавт., 2005; Fang Y. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Stojanovic J., 2009; Padgett L.E. et al., 2013]. В частности, IL-2 и IL-4 являются иммунорегуляторными цитокинами, ростовыми и стимулирующими факторами для различных субпопуляций лимфоцитов (Т-, В-лимфоцитов, НК-клеток) [Симбирцев А.С., 2004; Лебедев Л.Р. и соавт., 2007; Grinberg-Bleyer Y. et al., 2010]. Являясь провоспалительным цитокином, TNF α активирует лимфоциты и моноциты, регулирует их апоптоз и процессы коммуникации иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления [Пальцев М.А. и соавт., 2003; Vujanovic N.L.,

2011]. TNF α способен оказывать цитотоксическое влияние на β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы и фолликулярный эпителий щитовидной железы [Bruun C. et al., 2005; Chen M. et al., 2005; Nakahara M. et al., 2009; Varanasi V. et al., 2012; Padgett L.E. et al., 2013].

Существующие в настоящее время клинические и экспериментальные данные относительно участия цитокинов в патогенезе аутоиммунных эндокринопатий достаточно противоречивы. С одной стороны, существует гипотеза о том, что сахарный диабет 1 типа и аутоиммунный тиреоидит протекают по Th1-типу иммунного ответа [Кандроп В.И., 2008; Dardalhon V., 2008; Poncin S. et al., 2008], тогда как для латентного аутоиммунного диабета взрослых и болезни Грейвса свойственно усиление в патогенезе роли Th2-пути иммунного ответа [Кандроп В.И., 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2010]. С другой стороны, в литературе приводятся данные о том, что модель строгой поляризации иммунного ответа и ее связи с клиническим течением эндокринопатий аутоиммунного генеза требует значительного расширения. Указывается на необходимость уточнения роли в развитии аутоиммунных эндокринопатий баланса продукции цитокинов с про- и противовоспалительными функциями (таких как IL-2, IL-4 и TNF α) [Rabinovitch A., 2003; Atkinson M.A., 2005; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Fang Y. et al., 2008; Culina S., Mallone R., 2011]. В связи с этим, исследования, направленные на изучение состояния цитокин-рецепторной системы IL-2, IL-4 и TNF α , дополняют существующие представления о механизмах развития аутоиммунного повреждения эндокринных желез, а полученные знания могут способствовать совершенствованию методов диагностики заболеваний и обоснованию новых подходов эффективного терапевтического воздействия.

Цель исследования: установить общие закономерности и особенности состояния цитокин-рецепторной системы IL-2, IL-4 и TNF α при сахарном диабете и тиреопатиях аутоиммунного генеза.

Задачи исследования:

1. Установить общие закономерности и особенности субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺CD56^{low}-, CD19⁺-клетки) в крови у больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза, а также у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями в зависимости от клинической формы заболевания.
2. Дать характеристику спектру аутоантител (к поверхностному антигену β-клетки, декарбоксилазе глутаминовой кислоты, инсулину) при сахарном диабете 1 типа, латентном аутоиммунном диабете взрослых в зависимости от наличия микроангиопатий (нефро- или ретинопатии), а также аутоантител (к тиреоидной пероксидазе и рецептору тиреотропного гормона) при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса в зависимости от функционального состояния щитовидной железы.
3. Оценить продукцию цитокинов IL-2, IL-4 мононуклеарными лейкоцитами крови и количество лимфоцитов в крови, презентующих рецепторы к ним, у больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза, а также у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями в зависимости от клинической формы заболевания.
4. Оценить состояние системы TNFα (цитокин, мембраносвязанная и растворимая формы рецепторов) в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных сахарным диабетом 1 типа, латентным аутоиммунным диабетом взрослых в зависимости от наличия микроангиопатий, аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса при различных функциональных состояниях щитовидной железы.

Научная новизна. Впервые представлен комплекс данных о нарушениях в системе цитокинов IL-2, IL-4, TNFα и их рецепторов у пациентов с различными клиническими вариантами аутоиммунного повреждения поджелудочной и щитовидной желез. Установлено, что в механизмы развития сахарного диабета аутоиммунного генеза и

аутоиммунных тиреопатий вовлечены цитокины как Th1- (IL-2, TNF α), так и Th2-профиля (IL-4).

Определено, что закономерным для пациентов с аутоиммунными тиреопатиями, латентным аутоиммунным диабетом взрослых без микроангиопатий и сахарным диабетом 1 типа является увеличение количества лимфоцитов в крови, несущих рецепторы к IL-4, при отсутствии изменений концентрации IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, повышение продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови и снижение концентрации растворимой формы рецептора к TNF α в супернатантах клеточных культур. Показано, что для аутоиммунных тиреопатий характерно снижение концентрации TNF α в супернатантах клеточных культур и количества CD120-позитивных лимфоцитов в крови, независимо от функционального состояния щитовидной железы, а также снижение количества CD25-презентирующих лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса при эутиреозе и гипертиреозе. В совокупности с данными о повышении концентрации органоспецифических аутоантител, увеличении содержания CD3-позитивных лимфоцитов при снижении количества CD16⁺CD56^{low}-клеток в крови у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза независимо от наличия микроангиопатий, а также у больных аутоиммунными тиреопатиями в состоянии эутиреоза, гипертиреоза, указанные изменения в системе цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов могут рассматриваться как факторы, способствующие поддержанию аутоиммунного воспаления.

Приведены новые данные, указывающие на связь изменений в системе цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов с выраженностью гормонально-метаболических нарушений, что подтверждается следующими результатами: повышенной продукцией мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF α и увеличенным количеством лимфоцитов в крови, несущих комплементарные им рецепторы, у пациентов с латентным аутоиммунным диабетом взрослых, имеющих микроангиопатии; сниженной продукцией мононуклеарными

лейкоцитами IL-2 – при гипотиреозе и повышенной его концентрацией в культуре мононуклеарных лейкоцитов – при гипертиреозе у больных аутоиммунными тиреопатиями.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования расширяют фундаментальные знания о характере нарушений в системе цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов при различных вариантах сахарного диабета аутоиммунного генеза и аутоиммунных тиреопатий с учетом особенностей их клинического течения. На основе полученных данных могут быть определены диагностические маркеры и потенциальные мишени новых, патогенетически обоснованных подходов направленной коррекции аутоиммунного повреждения поджелудочной и щитовидной желез. В дальнейшем целесообразным представляется моделирование эффектов блокады действия IL-2 и TNF α у больных аутоиммунным сахарным диабетом, а также коррекции дефицита CD16⁺CD56^{low}-клеток и угнетения системы TNF α при аутоиммунных тиреопатиях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изменения в клеточном и гуморальном звеньях иммунной системы при аутоиммунном сахарном диабете и аутоиммунных тиреопатиях являются однонаправленными; функциональная активность лимфоцитов и выраженность нарушений в системе цитокинов Th1- (IL-2, TNF α) и Th2-профиля (IL-4) зависит от особенностей клинического течения заболеваний.
2. У больных латентным аутоиммунным диабетом взрослых без микроангиопатий, сахарным диабетом 1 типа (независимо от наличия нефро- или ретинопатии), а также у пациентов с болезнью Грейвса в фазе гипертиреоза повышенная продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови сочетается с увеличением в крови количества лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4, при неизменной продукции IL-4.

3. Латентный аутоиммунный диабет взрослых, отягощенный нефро- или ретинопатией, характеризуется повышением продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови, количества CD120-позитивных лимфоцитов и снижением концентрации растворимого рецептора к TNF α ; при аутоиммунных тиреопатиях система TNF α угнетается – снижается продукция TNF α и растворимой формы рецепторов к TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови, уменьшается число лимфоцитов, несущих рецепторы к TNF α .

Апробация и внедрение результатов работы. 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), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), II International Scientific Conference "Future development of Science and Technology (Przemysl, Poland, 2011), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания: современные подходы к диагностике и лечению» (Томск, 2012), V Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов (Архангельск, 2012), VI Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2013).

Исследования поддержаны ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственные контракты № 02.740.11.0311; № 16.740.11.0636; соглашение № 8302), грантом совета при Президенте России для поддержки молодых российских ученых (соглашение № 16.120.11.1233-МД), грантом совета при Президенте России для поддержки ведущих научных школ (соглашение № 16.120.11.614-НШ), РФФИ № 12-04-31224 мол_а.

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (разделы «Патофизиология эндокринной системы», «Роль иммунной системы в патологии. Аллергия»), молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярные основы патологии»), морфологии и общей патологии (раздел «Типовые патологические процессы») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них – 9 статей в центральных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), выводов и списка цитированной литературы, включающего 223 источников, из них – 46 отечественных, 177 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 5 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления об этиологии и патогенезе аутоиммунных эндокринопатий

Аутоиммунные эндокринопатии относятся к хроническим заболеваниям, при которых развиваются аутоагрессивные органоспецифические реакции, приводящие к дисфункции гормон-продуцирующих структур эндокринной железы [Никонова, Т.В., 2006; Кандроп В.И., 2008; Akesson C. et al., 2010; Ланин Д.В. и соавт., 2011, Salinas G.F. et al., 2013]. В настоящее время наиболее актуальными проблемами эндокринологии являются такие эндокринопатии аутоиммунного генеза как аутоиммунный сахарный диабет и аутоиммунные тиреопатии (хронический аутоиммунный тиреоидит и болезнь Грейвса), что во многом объясняется не только достаточно высоким уровнем заболеваемости, но и многочисленностью органов и систем, вовлекаемых в патологический процесс, а также существенным ухудшением качества жизни пациентов при данных заболеваниях.

В процессе изучения возможных причин возникновения аутоиммунных эндокринопатий был сформирован ряд концепций. Одной из них является теория молекулярной мимикрии [Драник Г.Н., 1999; Quaratino S. et al., 2005], согласно которой, пептиды бактериального или вирусного происхождения имеют структурное сходство с аутоантигенами, а специфические клоны иммунокомпетентных клеток реагируют как на чужеродный, так и на аутоантиген. Предполагают существование мимикрии между бактериальными антигенами *Yersinia Enterocolitica* и антигеном мембраны тиреоцита, включающего рецептор тиреотропного гормона [Wilkin T.J. et al., 1990]. Установлено, что у ряда вирусов, в частности Коксаки, цитомегаловирусов, часть белковой молекулы состоит из последовательности в 24 аминокислоты, такой же, как и в β -клетках островков Лангерганса. В результате сенсibilизированные к этим вирусам Т-лимфоциты реагируют на собственный белок β -клеток как на вирус,

разрушая инсулин-продуцирующую паренхиму поджелудочной железы [Сарвилина И.В. и соавт., 2007]. В щитовидной железе больных тиреоидитом Хашимото часто обнаруживаются вирус гепатита С, парвовирус В19, вирус Коксаки и вирус герпеса, что позволило сформулировать гипотезу о роли вирусной инфекции в возникновении аутоиммунного интратиреоидного воспаления [Mori K., Yoshida K., 2010].

Основываясь на результатах собственных исследований триггерных механизмов, В. Seddon et al. указывают на роль факторов окружающей среды неинфекционной природы в развитии эндокринопатий аутоиммунного генеза. Так, например, аутоиммунный тиреоидит вызывали у крыс воздействием гамма-облучения в сублетальных дозах [Seddon B. et al., 1999]. Предполагается, что данный эффект связан с модификацией собственных антигенов при действии ионизирующего излучения, в результате чего аутоантигены распознаются иммунной системой как чужеродные [Seddon B., et al., 1999; Сарвилина И.В. и соавт., 2007].

Подобное развитие аутоиммунных заболеваний при действии неблагоприятных факторов внешней среды во многом обусловлено генетической предрасположенностью. Для аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий выявлена связь с наследованием определенных генов главного комплекса гистосовместимости (HLA), который играет немаловажную роль в реализации иммунного ответа. Установлено, в частности, что тиреоидит Хашимото ассоциируется с HLA-DR3-фенотипом [Kahaly G.J., 2007], болезнь Грейвса – с HLA-DR3- и HLA-DRB1-фенотипом [Tommer Y., 2010; Jang H.W. et al., 2011]. Помимо генов, кодирующих молекулу HLA, аутоиммунные тиреопатии связаны с генетической предрасположенностью, которая определяется полиморфизмом двух генов, регулирующих функцию Т-клеток: CTLA-4 и PTPN-22 [Siminovitch K.A., 2004; Tommer Y., 2010].

Особенно детально исследуется связь различных аллелей HLA с развитием аутоиммунного сахарного диабета. J. Nerup предложил модель

аутоиммунной деструкции β -клеток, центральное место в которой отводится антигенам главного комплекса гистосовместимости (HLA) – аллелям DR3 и/или DR4, антигенам локуса DQw8 и DQw3,2 [Nerup J., 1989]. Более поздние исследования показали связь с предрасположенностью к развитию аутоиммунного диабета локусов, получивших обозначения IDDM1 и IDDM2, соответственно, определяющих около 42% семейного риска развития аутоиммунного сахарного диабета [Иванов В.И., Киселев Л.Л., 2005]. Исследования, проведенные на линии NOD-мышей, выявили, что развитие аутоиммунного диабета связано с HLA II класса, который кодирует одну молекулу I-Ag7 (ее аналогом у человека является HLA-DQB1) [Atkinson M.A., 1999]. Кроме того, у лиц с данным аллелем, предрасположенных к развитию аутоиммунного сахарного диабета, выявлена нестабильность молекулы HLA и сниженная способность к связыванию T-клеточного рецептора (TCR) и антигена [Corper A.L., et al., 2000]. Предполагается, что подобный дефект ведет к уменьшению сродства комплекса TCR/антиген/HLA и быстрой диссоциации пептидов в процессе негативной селекции в тимусе. Таким образом, аутореактивные T-лимфоциты ускользают на периферию. С учетом новых данных, полученных на примере изучения патогенеза аутоиммунного сахарного диабета, сформулирована теория о роли взаимодействия генов, способствующих или препятствующих развитию аутоиммунного заболевания [Eisenbarth G., 2001; Atkinson M., 2005].

В результате нарушения иммунной регуляции эффекторные реакции (образование антител, активация системы комплемента, формирование иммунных комплексов, наработка цитотоксических T-лимфоцитов и продукция широкого спектра цитокинов) оказываются направлены против собственных клеток и тканей организма [Колесник Ю.М., Орловский М.А., 2004; Кандрор В.И., 2008].

Рассматривая патогенез аутоиммунного сахарного диабета (СД), следует отметить, что потеря иммунологической толерантности по отношению к β -клеткам поджелудочной железы ведет к постепенной утрате способности

железы продуцировать инсулин. В механизмах формирования и прогрессирования аутоиммунного сахарного диабета важная роль принадлежит аутореактивным Т-лимфоцитам и регуляторным Т-клеткам.

В качестве основных антигенов, приводящих к активации Т-клеток с последующим формированием клеточного инфильтрата поджелудочной железы, рассматриваются декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD), тирозинфосфатоподобный пептид, инсулин и поверхностный антиген β -клеток островков Лангерганса [Pugliese A., 2010]. При аутореактивном инсулите поджелудочную железу в большом количестве инфильтрируют $CD4^+$ -лимфоциты Th1- и Th2-типа и цитотоксические $CD8^+$ -лимфоциты [Dogan Y. et al., 2006], приводя к клеточно-опосредованной аутоиммунной деструкции β -клеток поджелудочной железы путем гибели их апоптозом или некрозом. Так, Th-лимфоциты выделяют широкий спектр цитокинов, выполняющих функции медиаторов межклеточной коммуникации, привлекающих в поджелудочную железу различные иммунокомпетентные клетки, а также непосредственно влияющих на β -клетки островков Лангерганса. Т-клетки $CD8^+$, обладая цитотоксической и цитокинпродуцирующей активностью, также опосредуют механизмы деструкции инсулинпродуцирующей паренхимы [Berner B. et al., 2000; Santangelo C. et al., 2001; Rabinovitch A., 2003; Chang Y. et al., 2005].

Особая роль в патогенезе аутоиммунного диабета принадлежит специализированной субпопуляции Т-клеток – регуляторным Т-лимфоцитам (Т-reg), способных подавлять аутоиммунный ответ [Cools N. et al., 2007]. В Т-регуляторных клетках экспрессируется транскрипционный фактор FOXP3, биологическая функция которого заключается в блокировании транскрипционных факторов NFAT и NF-kB, и, как следствие, депрессии продукции цитокинов (IL-2, -4, IFN γ), а также снижении функциональной активности аутореактивных клеток [Bettelli E. et al., 2005; Rudensky A.Y., et al., 2006] (рис.1). У пациентов с аутоиммунным диабетом установлено значительное снижение супрессорной функции $CD4^+CD25^+$ Т-reg, по

сравнению с T-reg-клетками здоровых доноров, в то время как их количество в крови остается либо нормальным [Lindley S. et al., 2005], либо снижается [Lawson J.M. et al., 2008].

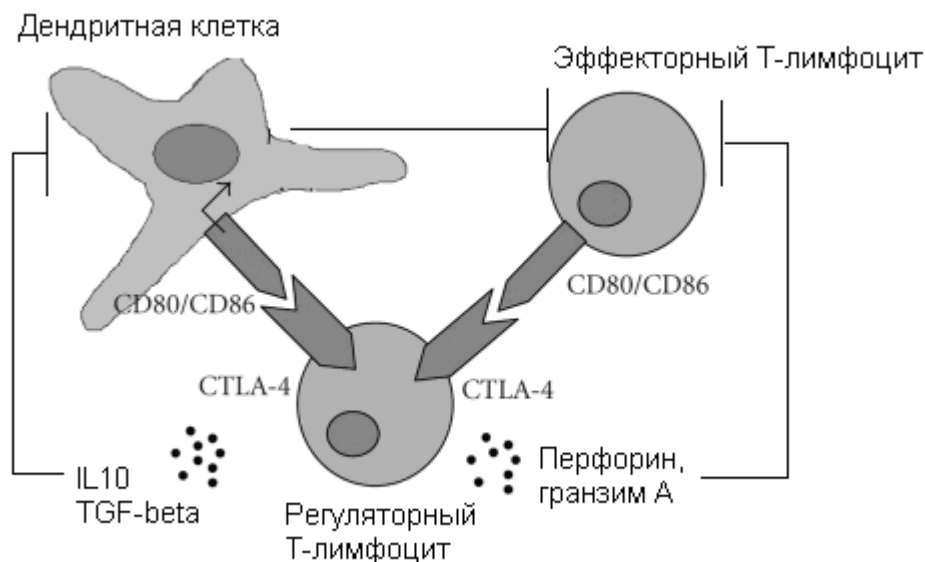


Рис. 1. Механизмы взаимодействия регуляторных T-клеток с эффекторными T-лимфоцитами и антигенпредставляющими дендритными клетками [по данным N. Cools et al., 2007]

Дополнительный вклад в дисбаланс между эффекторными и регуляторными свойствами T-лимфоцитов вносят такие антигенпредставляющие клетки, как моноциты, макрофаги и, особенно, дендритные клетки [Korf H. et al., 2010]. При попадании в очаг воспаления незрелые дендритные клетки взаимодействуют с антигенами, под воздействием провоспалительных сигналов созревают и обретают способность стимулировать пролиферацию антигенспецифичных $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T-клеток [Lam-Tse W.K., 2002], поддерживая тем самым иммунологическую толерантность. При аутоиммунном диабете в эксперименте на линии NOD-мышей выявлено затруднение созревания дендритных клеток и снижение способности к стимуляции ими T-лимфоцитов [Tandon N. et al., 1994; Many M. et al., 1995; Salmaso C. et al., 2002].

Следует подчеркнуть, что Т-клеточная популяция лимфоцитов не является единственной, определяющей развитие аутоиммунного сахарного диабета. Это подтверждает исследование, в котором ингибитор Т-клеток (циклоsporин) не предотвращал развитие сахарного диабета, а лишь задерживал его [Carel J.C. et al., 1996]. Большой вклад в развитие заболевания вносят В-клетки, роль которых в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета состоит в их активации, сопровождающейся трансформацией в плазматические клетки и выработкой органоспецифических антител. Аутоантитела опосредуют комплемент- и антителозависимый механизм цитотоксичности, в результате чего происходит разрушение β -клеток, синтезирующих инсулин. Дискутабельной является роль аутоантител в возникновении осложнений аутоиммунного диабета [Колесник Ю. М., Орловский М. А., 2004; Storling I. et al., 2005]. Кроме того, исследования последних лет указывают на наличие ряда других функций В-клеток, обеспечивающих им способность влиять на локальные Т-клеточные реакции в поджелудочной железе [Wong F.S. et al., 2010; Chamberlain J.L. et al., 2011], однако точные их механизмы до настоящего времени окончательно не выяснены.

Рассматривая аутоиммунный сахарный диабет, можно выделить классический сахарный диабет 1 типа (СД1) и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA). Данные заболевания имеют ряд общих генетических и иммунологических черт, однако, между СД1 типа и LADA существует важная отличительная особенность – это скорость развития недостаточности инсулина, которая при LADA типе наступает значительно позже, чем при СД1 [Seissler J., 2008; Korf H. et al., 2010; Tuomi T. et al., 2010]. Проведенные исследования указывают на наличие различий в реактивности иммунных клеток при LADA и СД1 [Naik R.G. et al., 2009], что подразумевает существование разных механизмов формирования и прогрессирования этих форм диабета.

СД1 характеризуется активацией иммунного ответа, который поддерживается Th1- и Th17-клонами лимфоцитов [Dardalhon V., 2008]. Показано, что снижение экспрессии IFN γ (маркера Th1) и сдвиг фенотипа Th-клеток от 1-го ко 2-му приводит к снижению случаев развития СД у NOD-мышей [Alleva D.G. et al., 2006]. В свою очередь LADA (диабет, протекающий с преобладанием титров GAD-антител [Amrouche C. et al., 2008; Andersen M.K. et al., 2010; Maruyama T. et al., 2011]) связан с пролиферацией Th2-клонов лимфоцитов [Zhang Y. et al., 2010]. Данный факт дает возможность предполагать, что более длительная сохранность инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы при LADA обусловлена преобладанием активации гуморальных иммунных реакций. Особое значение в патогенезе LADA отводится декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD65) – ферменту, синтезирующемуся в β -клетках поджелудочной железы. Исследования показали, что введение пациентам с LADA рекомбинантной изоформы GAD65 способствует восстановлению иммунологической толерантности посредством индукции пролиферации GAD65-специфичных регуляторных T-клеток [Agardh C.D. et al., 2005] и последующим снижением антителопродукции B-лимфоцитами.

Кроме того, при LADA отмечено повышение относительного содержания CD8⁺-лимфоцитов в крови по сравнению с количеством их у здоровых лиц, а также повышение относительного количества T-регуляторных клеток, сочетающихся со снижением содержания в них внутриклеточного транскрипционного фактора FOXP3, что указывает на дефект супрессорной функции [Yang Z.F., et al., 2006, 2007]. В работе S. Akesson [2010] показано, что у пациентов с LADA, по сравнению с больными СД1 и здоровыми людьми, содержание в крови NK-лимфоцитов снижено. В то же время в популяции NK-клеток у больных LADA было отмечено угнетение экспрессии иммуноглобулинподобного рецептора KIR, обеспечивающего киллерную функцию иммунных клеток [Akesson S. et al., 2010]. Наряду с этим, в работах отечественных авторов различий в

субпопуляционном составе лимфоцитов (CD4, CD8, CD16, CD19) между пациентами с СД1, LADA и здоровыми лицами обнаружено не было [Дедов И.И. и соавт., 2005].

Подобно аутоиммунному СД, при аутоиммунных тиреопатиях, несмотря на наличие общего аутореактивного компонента, для каждой нозологии существуют определенные различия в механизмах развития, в первую очередь отражающихся на функции эндокринной железы.

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) представляет собой аутоиммунное заболевание щитовидной железы (ЩЖ), характеризующееся безболезненным диффузным ее увеличением и лимфоидной инфильтрацией, которое сопровождается прогрессирующим гипотиреозом и появлением в крови аутоантител к тиреоглобулину (ТГ) и тиреоидной пероксидазе (ТПО) [Сарра М. et al., 2011]. Гипотиреоз при данном заболевании вызван гибелью тиреоцитов и замещением их лимфоидными элементами и стромой [Браверман Л.И., 2000].

Как и в случае аутоиммунного сахарного диабета, в регуляцию клеточно-опосредованного иммунного ответа при хроническом аутоиммунном тиреоидите вовлечены $CD8^+$ -лимфоциты и Th-клоны лимфоцитов, выделяющие цитокины различного спектра действия. В патогенезе АИТ преобладающим считают Th1-иммунный ответ, но при этом реализуют свое действие также Th2- и Th3-клоны лимфоцитов. Th1-клетки посредством локальной продукции цитокинов могут ослабить функцию ЩЖ через изменение синтеза гормонов и снижение числа тиреоцитов путем активации их гибели. Th2-клоны лимфоцитов, очевидно, участвуют в контроле производства антител, подавлении иммунного ответа, а синтезируемые цитокины Th2-профиля способны блокировать тиреоспецифический эффект Th1-цитокинов [Poncin S. et al., 2008].

Активация гуморального звена иммунитета путем взаимодействия Th-лимфоцитов с В-клетками в присутствии аутоантигенов сопровождается синтезом аутоантител к структурам фолликулярного эпителия. Считается,

что наиболее выраженное цитотоксическое действие на тиреоциты оказывают антитела к ТПО. Они фиксируют на своих специфических участках связывания комплемент и тем самым определяют антителозависимую комплемент-опосредованную цитотоксичность [Кандрор В.И., 2006]. В отношении антител к ТГ установлено, что они обладают цитотоксическим потенциалом, но в комплемент-зависимом цитолизе ткани ЩЖ участия не принимают [Barsouk A. et al., 1996].

Помимо действия комплементфиксирующих цитотоксических аутоантител, гибель тиреоцитов связана с активацией программы апоптоза. Наиболее изучен путь активации апоптотической программы, в которой задействован Fas-рецептор (CD95), экспрессирующийся на мембране тиреоцитов [Giordano C. et al., 1997; Крайнова С.И. и соавт., 2004; Кандрор В.И. и соавт., 2006; Stojanovic J., 2009]. Исследователи отмечают, что в щитовидной железе у больных АИТ количество тиреоцитов, экспрессирующих CD95 и претерпевающих апоптоз, повышено. Наибольшее число апоптотических клеток находится в области разрушения фолликулов вблизи от лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу. Данный факт согласуется с информацией о том, что при АИТ инфильтрирующие железу лимфоциты характеризуются повышенной экспрессией FasL. Кроме того, для морфологической картины ткани ЩЖ при АИТ характерно большое скопление плазмочитов вокруг CD95⁺-тиреоцитов [Bretz J.D., 2001; Крайнова С.И. и соавт., 2004; Геворкян А.Г. и соавт., 2007].

При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов в крови у пациентов с АИТ в ряде исследований было выявлено увеличение содержания Th-лимфоцитов, NK- и В-клеток, в то время как количество цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов оказалось сниженным [Massart C. et al., 1999; Геворкян А.Г. и соавт., 2007]. Приводятся также данные о снижении общего количества Т-лимфоцитов и повышении числа В-лимфоцитов в фазу эутиреоза, тогда как дефицит цитотоксических CD8⁺-клеток выявлялся

только в стадии гипотиреоза [Глазанова Т.В. и соавт., 2000; Дамбаева И.М. и соавт., 2007].

Болезнь Грейвса (БГ) клинически проявляется поражением щитовидной железы (ЩЖ) с развитием синдрома тиреотоксикоза. В патогенезе БГ особое значение придается образованию стимулирующих антител к рецептору ТТГ (АТ-рТТГ). Эти антитела связываются с рецептором ТТГ, приводят его в активное состояние, запуская аденилатциклазную систему, что стимулирует захват ЩЖ йода, синтез и высвобождение тиреоидных гормонов. В результате развивается синдром тиреотоксикоза, доминирующий в клинической картине БГ [Фадеев В.В., Мельниченко Г.А., 2005].

В отличие от АИТ, протекающего с деструкцией тиреоцитов, для БГ характерна их пролиферация. В щитовидной железе у пациентов с БГ обнаруживается лимфоидная инфильтрация, хотя и выраженная в меньшей степени, чем при АИТ. В то же время найдена корреляция между степенью лимфоидной инфильтрации щитовидной железы при БГ и экспрессией маркера пролиферации Ki-67 на тиреоцитах: чем больше выражена очаговая лимфоидная инфильтрация, тем интенсивнее оказываются рост и пролиферация тиреоцитов. Предполагается, что стимуляция пролиферации в этих случаях объясняется прямым контактом мононуклеарных лейкоцитов, в частности активированных лимфоцитов, с тканью ЩЖ [Arao T. et al., 2000; Кандрор В.И. и соавт., 2006, 2008].

Предполагается что, помимо активации пролиферации, увеличение количества тиреоцитов при БГ связано с замедлением их спонтанной или индуцированной гибели. Рядом исследователей установлено, что титр антител к тиреоидной пероксидазе при БГ намного ниже, чем при АИТ, в результате чего минимизируются эффекты антителозависимой комплемент-опосредованной цитотоксичности [Кандрор В.И. и соавт., 2006; Исаева М.А. и соавт., 2007]. Изучение механизмов апоптотической гибели тиреоцитов выявило ограничение презентации на мембране данных клеток Fas-рецептора

[Крайнова С.И. и соавт., 2004], что может защищать тиреоциты от воздействия FasL-экспрессирующих лимфоцитов.

Большинство внутритиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса – это Т-лимфоциты, тогда как В-клеточные конгломераты встречаются гораздо реже, чем, например, при АИТ. В отличие от АИТ, среди клеток лимфоидного инфильтрата при БГ обнаружено преобладание лимфоцитов Th2-типа (а не Th1-типа или цитотоксических Т-лимфоцитов), которые секретируют цитокины, стимулирующие продукцию антител В-лимфоцитами [Кандрор В.И., 2008]. В то же время показано участие Th2- и Th3-клонов лимфоцитов в формировании цитокинового окружения при БГ [Глазанова Т.В. и соавт., 2004; Gianoukakis A.G. et al., 2008].

С учетом накопленных данных о популяциях Th-лимфоцитов в инфильтрате щитовидной железы при АИТ и БГ формируется мнение о том, что при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы отсутствует выраженный пролиферативный сдвиг в сторону Th1- или Th2-типа клеток, и цитокины, присущие обоим типам Th-лимфоцитов, могут продуцироваться одновременно. При этом течение иммунного ответа в щитовидной железе определяется функционально доминирующей в данный момент популяцией Th-клеток.

Данные о состоянии субпопуляционного состава лимфоцитов при БГ противоречивы. Так, ряд авторов обнаруживали снижение числа CD3⁺-клеток при повышении количества CD8⁺- и CD19⁺-лимфоцитов, а также снижение активности Т-регуляторных клеток, нарушение реакции угнетения миграции макрофагов и лимфоцитов [Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2003]. Кроме того, выявлен дефект субпопуляции натуральных киллеров (НК-клеток), который проявляется как снижением спонтанной и стимулированной IL-2 и IFN β цитотоксичности, так и нарушением выработки данными клетками цитокинов, в частности TNF α [Solerte S.B., 2005]. Результаты исследований других авторов свидетельствуют как о снижении количества CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов и повышении числа НК-клеток, так и об отсутствии изменений

со стороны данных показателей [Геворкян А.Г. и соавт., 2007; Савченко А.А. и соавт., 2008].

Установлено также, что в патогенез АИТ и БГ вовлечены дендритные клетки. В эксперименте на линии ВВ-DR крыс показано, что дендритные клетки, инфильтрирующие щитовидную железу, подобно дендритным клеткам, присутствующим в инфильтрате поджелудочной железы при аутоиммунном СД, пребывали в незрелом состоянии [Simons P.J. et al., 2000]. Однако точные механизмы выявленного дефекта установлены не были.

Рассматривая аутоиммунные заболевания поджелудочной и щитовидной железы, нельзя не упомянуть о существовании сочетанных вариантов данных эндокринопатий. Аутоиммунный полигландулярный синдром (АПС) характеризуется аутоиммунным механизмом поражения двух и более эндокринных желез [Kahaly G.J., 2007]. АПС 1 типа является аутосомно-рецессивным заболеванием, обусловленным мутацией гена AIRE, в результате которой нарушается экспрессия органоспецифических аутоантигенов в тимусе в период формирования Т-клеток. Это приводит к нарушению иммунной ауторегуляции, в том числе и по отношению к аутоантигенам щитовидной и поджелудочной железы [Liston A., 2004]. Для данного типа АПС основными компонентами являются гипопаратиреоз и болезнь Аддисона. Аутоиммунный сахарный диабет в данном случае является дополнительным компонентом синдрома и в ряде случаев может отсутствовать. В отличие от АПС 1 типа, АПС 2 типа наследуется аутосомно-доминантно, при этом тремя основными составляющими данного синдрома являются аутоиммунная патология щитовидной железы, сахарный диабет 1 типа и болезнь Аддисона. У пациентов с АПС 2 типа определяется более выраженная, чем при спорадически встречающихся аутоиммунных заболеваниях, ассоциация с гаплотипами HLA-A1, -B8, -DR3 [Weetman A.P., 2005]. Показано также, что при АПС 2 типа определяется дефект регуляторных Т-лимфоцитов. Так, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Т-клетки имели нормальный фенотип, но у них обнаруживалось нарушение способности

подавлять пролиферацию аутореактивных Т-клеток [Ehrenstein M.R. et al., 2004; Kriegel M.A. et al., 2004]. Помимо нарушения функции регуляторных лимфоцитов, как и в случае изолированных вариантов эндокринопатий, для сочетанных аутоиммунных заболеваний характерна вовлеченность в патогенез дефекта функции дендритных клеток, цитотоксических, Th1- и Th2-лимфоцитов, дизрегуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток и клеток эндокринных желез [Sakaguchi S., 2000; Betterle C. et al., 2004; Eisenbarth G.S., Gottlieb P.A., 2004; Kriegel M.A. et al., 2004; Kahaly G.J., 2007].

Таким образом, развитие заболеваний поджелудочной и щитовидной железы аутоиммунного генеза зависит от ряда факторов, включая природу аутоантигенов, взаимодействие антигенпредставляющих клеток с аутоантигенами и Th-лимфоцитами, преобладание активации одного из типов Th-клеток, особенности формирования цитокиновой сети, соотношение выраженности клеточных и гуморальных компонентов иммунного ответа, наследственные варианты реактивности иммунной системы [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Это, вероятно, определяет клиническую гетерогенность аутоиммунных заболеваний одной локализации, наличие общих звеньев патогенеза аутоиммунных эндокринопатий с различной локализацией и существование сочетанных вариантов эндокринопатий аутоиммунного генеза.

1.2 Роль цитокинов и их рецепторов в патогенезе аутоиммунного воспаления

Цитокины – низкомолекулярные белки с выраженной биологической активностью, являются необходимыми трансмиссерами межклеточного взаимодействия как в норме, так и при патологии. Цитокиновые молекулы участвуют в пролиферации, дифференцировке, репарации, регенерации, клеточной миграции, обеспечивают ответную реакцию на иммунное повреждение и воспаление [Arend W.P., 2001; Симбирцев А.С., 2004; Weetman A.P., 2004; Fang Y. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Stojanovic J.,

2009; Grinberg-Bleyer Y. et al., 2010; Vujanovic N.L., 2011; Padgett L.E. et al., 2013]. Цитокины, как регуляторы иммунологической реактивности, имеют важное значение в развитии многих аутоиммунных процессов, в том числе при эндокринопатиях аутоиммунного генеза. Синтезируясь в очаге воспаления, цитокины воздействуют на макрофаги, гранулоциты, Т- и В-лимфоциты, клетки эндотелия и другие клетки, участвующие в воспалительной реакции [Симбирцев А.С., 2004]. Развитие иммунопатологических состояний, в частности, связанных с возникновением аутореактивных состояний, часто ассоциировано с дисбалансом клонов Th-лимфоцитов и спектра продуцируемых ими цитокинов [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Цитокины способны проявлять биологическую активность дистантно, секретируясь в свободном виде клеткой-продуцентом. В некоторых случаях они могут экспрессироваться на поверхности стимулированных клеток в виде мембранассоциированных молекул, будучи биологически активными при межклеточном контакте [Симбирцев А.С., 2004; Firestein G. et al., 2006]. Однако независимо от того, секретируются цитокины или только экспрессируются, они обладают общим свойством – связываются со специфическими рецепторами на клетках-мишенях. Являясь гидрофильными молекулами, цитокины взаимодействуют с соответствующими поверхностными клеточными рецепторами и запускают каскад внутриклеточных сигналов, приводящих к реализации определенного эффекта. Цитокиновые рецепторы не участвуют непосредственно в регуляции экспрессии генов, а запускают механизм проведения сигнала через плазматическую мембрану за счет активации лиганд-рецепторных комплексов [Пальцев М.А. и соавт., 2003].

Семейство цитокиновых рецепторов по структуре относится к классу рецепторов, содержащих один трансмембранный домен. Некоторые из них являются мономерами, другие состоят из нескольких субъединиц, формирующих структуру рецептора [Gonda T.J. et al., 1997]. Одни

полипептидные цепи, формирующие структуру рецептора, распознают и связывают цитокины, другие – служат для генерации сигнала, который передается в клетку [Фаллер Д.М., 2006].

По механизму передачи сигнала цитокиновые рецепторы относятся к рецепторам, не проявляющим каталитической активности, но ассоциированными с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами. Установлено, что связывание с лигандом приводит к димеризации мономерных рецепторов и активации Janus-киназ (JAKs) – тирозинкиназных цитоплазматических белков (JAK1, JAK2, JAK3 и Tyk2), ассоциированных с цитоплазматическим доменом цитокиновых рецепторов через консервативные последовательности рецепторов. Активированные JAKs фосфорилируют тирозины в цитоплазматическом домене цитокиновых рецепторов, в результате чего на них образуются сайты сигнальной трансдукции для молекул, содержащих SH2-домены. Помимо этого, JAKs передают внутриклеточные сигналы через фосфорилированные семейства латентных факторов транскрипции, называемых STAT-белками (signal transducers and activators of transcription). Предполагается, что каждый специфический цитокиновый рецептор передает сигнал с помощью уникального набора киназ и STAT-белков [Decker T., Kovarik P., 1999; Aaronson D.S., Horvath C.M., 2002; Ke S., Bin L., 2003]. На примере изучения проведения сигнала в клетку от интерферонов различных классов было установлено, что активированные протеинкиназы фосфорилируют цитозольные STAT-белки по остаткам тирозина. Фосфорформы STAT-белков димеризуются путем взаимодействия фосфотирозина одного мономера с SH2-доменом другого, и наоборот. В результате образуются активные гетеродимеры STAT1–STAT2, которые транслоцируются в ядро, где взаимодействуют с транскрипционными факторами и соединяются с регуляторными специфическими участками генома, активируя экспрессию генов [Aaronson D.S., Horvath C.M., 2002; Фаллер Д.М., 2006; Watling K.J., 2006]. Установлено, что при аутоиммунном СД в эффекторных Т-

лимфоцитах через JAK/STAT-путь проводится сигнал к пролиферации от IL-2. Обнаружено также, что TGF β ингибирует фосфорилирование и ассоциацию STAT-белков, предотвращая при этом IL-2-зависимую пролиферацию аутореактивных Т-клеток и замедляя развитие СД у NOD-мышей [Han H.S. et al., 1997].

Кроме того, для передачи цитокинового сигнала существует система внутриклеточных протеинкиназ: митогенактивируемых протеинкиназ (МАР-киназ), включающих p38 и JNK, а также фосфатидилинозитол-3-киназу [Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2005]. Высокоактивные провоспалительные цитокины (IL-1, IL-2, TNF α) активируют p38, JNK и стрессактивируемые протеинкиназы. Они запускают работу белковых транскрипционных факторов (NF-kB, активационного белка AP-1), передающих сигналы к генам, запускающим синтез воспалительных цитокинов, хемокинов, молекул клеточной адгезии, белков острой фазы и факторов роста [Кулинский В.И., 2007]. В частности, IL-1 активирует МАР-зависимый сигнальный путь в мононуклеарных лейкоцитах крови, приводящий к наработке ими TNF α .

При изучении механизмов деструкции β -клеток островков Лангерганса при аутоиммунном СД установлено, что в мононуклеарных лейкоцитах, инфильтрирующих поджелудочную железу, при действии IL-1 активируется как p38, так и JNK, после чего в клетке возрастает экспрессия мРНК TNF α и синтез цитокина, оказывающего цитотоксическое действие на инсулинпродуцирующие клетки [Lawrence M.C. et al., 2011].

Передача сигнала от IL-2 и IL-6 возможна не только с помощью механизмов STAT или NF-kB, но и с вовлечением Ras-зависимого пути, также сопряженного с протеинкиназами [Потапнев М.П., 2002; Фаллер Д.М., 2006; Roth M. et al., 2006]. Проведение сигнала на белок Ras приводит к активации МАР-киназ и клеточной пролиферации. Этот сигнальный путь является редокс-регулируемым процессом [Matsuzawa A. et al., 2005]. В эксперименте с использованием иммуномодулирующих препаратов одной из

причин предотвращения развития диабета у NOD-мышей оказалось улучшение Т-клеточной трансдукции сигнала к пролиферации через Ras-белок [Rapoport M.J. et al., 1996], что указывает на участие данного сигнального пути в разрешении аутоиммунной патологии.

Особенностью активации клеток через цитокиновые рецепторы является одновременная индукция экспрессии генов негативных регуляторов цитокинового сигнала – SOCS (suppressor of cytokine signaling), действующих по механизму отрицательной обратной связи. SOCS ингибируют передачу сигнала от рецепторов путем связывания JAKs и блокирования каталитической активности данных киназ, либо посредством связывания молекул STAT [Chong M.W. et al., 2004; Wormald S., Hilton D., 2004]. Проведенные исследования достоверно указывают на вовлеченность членов семейства SOCS-белков в патогенез аутоиммунных заболеваний. Показано, что блокирование наработки SOCS1 в CD8⁺-лимфоцитах NOD-мышей увеличивало частоту и тяжесть течения аутоиммунного диабета. Напротив, повышение продукции SOCS1 в цитотоксических лимфоцитах предотвращало развитие аутоиммунного инсулита в данной модели [Chong M. et al., 2004; Douglas C. et al., 2009].

Регулировать (ингибировать) активность цитокинов способны растворимые формы рецепторов. Данные рецепторы проявляют свое действие путем связывания свободных цитокинов, предупреждая их взаимодействие со специфическими мембранассоциированными рецепторами [Weckmann A.L., Acoscer-Varela J., 1996]. Эти ингибиторы представляют собой, как правило, экстрацеллюлярный домен мембранных рецепторов, находящихся в растворимой форме. Аффинность растворимых рецепторов к их лигандам обычно сопоставима с таковой мембранных рецепторов. Растворимые рецепторы могут появляться в результате протеолитического воздействия на связанные с мембраной рецепторы или альтернативного сплайсинга мРНК, кодирующей растворимые формы. Помимо торможения активности цитокинов, растворимые рецепторы могут

защищать их от протеолитической инактивации, продлевая таким образом период жизни цитокинов [Пальцев М.А. и соавт., 2003].

Современные исследования указывают на наличие дисбаланса в системе цитокинов и их рецепторов с про- и противовоспалительными функциями при аутоиммунных заболеваниях, что во многом определяет механизмы дизрегуляции клеточного и гуморального иммунитета, развитие аутоиммунной патологии.

Дифференцировка наивных Т-клеток в Th1- и Th2-направлении во многом зависит от влияния окружающих цитокинов до и после представления антигена. Появление IFN γ -продуцирующих клеток связано с проведением сигнала от IL-12 через активатор транскрипции 4 (STAT4) (рис. 4). STAT4-дефицитные мыши не отвечают на действие IL-12, имеют значительные нарушения в дифференцировке Th1- и склонность к усилению дифференцировки Th2-клеток. В противоположность этому, проведение сигнала от IL-4 через STAT6 способствует дифференцировке Th2. STAT6-дефицитные мыши имеют сниженную способность проводить сигнал от IL-4 и угнетают Th2-ответ [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Кроме этого, экспериментальные исследования, проведенные на STAT4- и STAT6-дефицитных мышах, показали следующее. У STAT6-дефицитных мышей, в отличие от STAT4-дефицитных, не развивался гипертиреоз и БГ, что говорит о решающем значении гуморальных иммунных реакций в развитии данного заболевания [Land K.J. et al., 2004]. При изучении участия STAT4 в формировании аутоиммунного диабета было показано, что STAT4-дефицитные мыши не болели аутоиммунным СД, состояние клеточного иммунитета в данном случае являлось определяющим [Holz A. et al., 1999].

Рассматривая участие цитокинов в аутоиммунном воспалении можно определить следующий спектр эффектов. Гиперпродукция IL-12 сопровождается формированием Th1-ответа, высокой пролиферацией лимфоцитов и продукцией IL-2, IL-17 и IFN γ . В модели IL-12R β 2 (-/-) нокаут-мышей дендритные клетки способствовали развитию Th2-ответа с низкой

продукцией $IFN\gamma$, что делало экспериментальных животных менее чувствительными к развитию спонтанных аутоиммунных заболеваний [Zhang G. et al., 2003]. Структурным гомологом IL-12 является IL-23, который продуцируется дендритными клетками и становится одним из важных факторов патогенеза аутоиммунных заболеваний. Установлено, что IL-23 в значительно большей степени, чем IL-12, активирует Th17-клетки к продукции IL-17, который обладает провоспалительной активностью и является одним из факторов, способствующих развитию аутоиммунных заболеваний. Цитокин IL-23 ответственен за экспансию в очаг воспаления популяции $CD4^+$ -клеток, продуцирующей IL-17, IL-6, $TNF\alpha$, но не секретирующей $IFN\gamma$ и IL-4. Было отмечено, что IL-23 повышает продукцию IL-10 $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитами [Eijnden S. et al., 2005]. В последующем было обосновано, что более мощными регуляторами продукции IL-17, по сравнению с IL-23, являются $TGF\beta$ и IL-6 [Bettelli E. et al., 2006; Mangan P. et al., 2006].

При аутоиммунных заболеваниях IL-17 характеризуется выраженной провоспалительной активностью в исследованиях *in vivo* и *in vitro*, а также обладает способностью индуцировать синтез различных медиаторов, включая IL-1, IL-6 и $TNF\alpha$ [Sheng X., Xuetao C., 2010]. Этот цитокин секретируется в основном $CD4^+$ -лимфоцитами и участвует в развитии ранней стадии аутоиммунного воспаления. Супрессорным эффектом на IL-17 обладает IL-27, опосредующий свое влияние через IL-27R на $CD4^+$ -клетках. Подавление IL-17 цитокином IL-27 требует активации транскрипционного фактора STAT1. У STAT1-дефицитных мышей повышается пролиферация Th17-клеток, продуцирующих IL-17, что увеличивает частоту развития у животных спонтанных аутоиммунных процессов [Batten M. et al., 2006; Veldhoen M. et al., 2006].

Оценка участия IL-18 в аутоиммунных процессах показала неоднозначность его действия. Так, введение IL-18 NOD-мышам на 4-й неделе жизни приводило к усилению Th1-опосредованного иммунного

ответа при развитии СД. При введении на 10-й неделе жизни IL-18 подавлял Th1-зависимый иммунный ответ, стимулируя пролиферацию Th2-лимфоцитов [Rothe H. et al., 1999; Oikawa Y. et al., 2003].

Основная роль IL-2 при аутоиммунном воспалении состоит в активации цитотоксических Т-лимфоцитов, стимуляции NK-клеток, индукции пролиферации В-лимфоцитов и иммунных клеток, обладающих регуляторной активностью. Дефицит IL-2 ассоциирован с отсутствием регуляторных CD4⁺CD25⁺Т-клеток [Furtado G., 2002]. У пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями в период ремиссии синтез и продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови сопоставима с данными показателями у здоровых лиц. В период обострения заболевания экспрессия мРНК IL-2 возрастает в иммунокомпетентных клетках крови, но оказывается наиболее выраженной в CD4⁺ Т-клетках [Gran B. et al., 2002].

Провоспалительный цитокин IL-6 усиливает В-клеточную пролиферацию и образование антител, индуцирует продукцию белков острой фазы, которые способствуют активации Т-лимфоцитов антигенпредставляющими клетками [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Уровень продукции IL-6 коррелирует с активностью аутоиммунного воспаления, а применение специфических к цитокину антител приводит к существенному снижению концентрации острофазных белков [Новиков А.А. и соавт., 2010].

Характерной чертой аутоиммунных заболеваний является повышение числа лимфоцитов периферической крови, которые экспрессируют мРНК IL-1 [Wang X. et al., 2000; Firestein G. et al., 2006]. Данный цитокин существует в форме IL-1 α , способной проводить сигнал в мембраносвязанном состоянии, и IL-1 β , действие которого возможно только после перехода в активную растворимую форму посредством взаимодействия с IL-1-конвертирующим ферментом ICE [Firestein G. et al., 2006]. Эффекты IL-1 находятся под контролем естественного рецепторного антагониста IL-1RA, препятствующего связыванию цитокина с его мембранным рецептором (IL-

1R). Соотношение продукции эндогенных IL-1 и IL-1RA имеет значение в развитии воспаления, включая тип иммунного ответа, по которому будет развиваться аутоиммунное заболевание [Matsuki I. et al., 2006]. У мышей, склонных к развитию аутореактивных процессов, при дефиците IL-1RA отмечена высокая воспалительная активность заболевания, снижающаяся после введения IL-1RA [Firestein G. et al., 2006].

Большое значение в патогенезе аутореактивных состояний отводится фактору некроза опухолей α . Вовлечение TNF α в воспалительную реакцию с повышением экспрессии мРНК TNF α и мРНК рецепторов к TNF α происходит на ранних этапах развития аутоиммунных заболеваний [Owens T. et al., 2001; Huang C. et al., 2002]. Помимо мембрансвязанных форм рецепторов к TNF α , существует свободная растворимая форма (sTNF-R) [Moss M. et al., 2008], роль которой в патогенезе аутоиммунных заболеваний изучена недостаточно.

Цитокин IL-10 при аутоиммунных заболеваниях проявляет противовоспалительную активность. Он способен подавлять экспрессию IL-1, IL-6 и TNF α , блокировать Т-клеточный антигенспецифичный ответ, ингибировать активность макрофагов [Новиков А.А. и соавт., 2010]. В то же время отмечается, что, в условиях значительно повышенной продукции цитокинов IL-12 и IFN γ , IL-10 не может подавить их провоспалительные эффекты, несмотря на нормальную экспрессию мРНК IL-10 и IL-10R [Balashov K. et al., 2000; Firestein G. et al., 2006].

Таким образом, активация и реализация эффекторных функций клеток, участвующих в развитии аутоиммунного воспалительного процесса, зависят от баланса широкого спектра цитокинов с про- и противовоспалительными свойствами. Различные иммунные клетки могут секретировать аналогичные цитокины, но действовать на разные клетки-мишени. Кроме того, эффект действия цитокинов может меняться в зависимости от концентрации и стадии развития заболевания. Так, в начальной стадии заболевания вовлечение эффекторных и регуляторных клеток в патологический процесс,

реализация их способности к продукции цитокинов могут ингибировать развитие заболевания, в то время как в острой фазе вовлечение в аутореактивный иммунный ответ тех же клеток и медиаторов приводит к деструкции органов и тканей.

1.3 Цитокиноопосредованные механизмы развития аутоиммунных заболеваний щитовидной и поджелудочной желез

Цитокины, как основные межклеточные медиаторы иммунной системы, принимают непосредственное участие в патологических реакциях, сопутствующих аутоиммунным эндокринопатиям. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной и поджелудочной железы задействован широкий спектр цитокинов [Bretz J.D., 2001; Weetman A.P., 2002; Rabinovitch A., 2003; Atkinson M.A., 2005; Poncin S. et al., 2008].

Патогенез аутоиммунного сахарного диабета изучается в основном на экспериментальной модели с использованием NOD-мышей, склонных к спонтанному развитию диабета. Эти исследования показывают, что аутоантигены β -клеток поджелудочной железы распознаются молекулами HLA на антигенпредставляющих клетках с последующим представлением их НК-клеткам и $CD8^+$ -лимфоцитам [Culina S., Mallone R., 2011]. Активируется выработка хемокинов, способствующая привлечению к панкреатическим островкам из лимфатических узлов эффекторных $CD4^+$ -лимфоцитов. Экспрессия на островковых клетках лигандов CXCL10 и CCL2 способствует быстрой миграции моноцитов/макрофагов, опережающей появление аутореактивных Т-клеток. Формированию клеточной инфильтрации сопутствует продукция иммунными клетками цитокинов.

В первую очередь, при развитии панкреатических аутоиммунных процессов, макрофаги и моноциты, НК-клетки периферической крови начинают синтезировать $IL-1\beta$, $INF\gamma$ и $TNF\alpha$. Согласно результатам экспериментальных исследований, $IL-1\beta$ рассматривается как ключевой

медиатор, вызывающий торможение секреции инсулина и стимулирующий экспрессию гена, кодирующего индуцибельную синтетазу азота — NOS2, которая приводит к образованию NO, подавлению пролиферации с последующим повреждением структуры ДНК β -клеток [Колесник Ю.М., Орловский М.А., 2004] (табл. 1). Установлено, что β -клетки подвергаются некрозу при действии IL-1 β в присутствии INF γ и TNF α , избыточного количества свободных радикалов кислорода, оксида азота. Это подтверждено в экспериментах на изолированных островках Лангерганса человека и грызунов *in vitro*. Было показано, что INF γ обладает выраженным локальным цитотоксическим действием на инсулинпродуцирующие клетки, усиливающимся при совместном его применении с IL-1 и/или TNF α [Bruun C. et al., 2005; Chen M. et al., 2005].

Помимо некротической гибели β -клеток поджелудочной железы, в очаге аутоиммунного воспаления происходит элиминация инсулинпродуцирующей паренхимы путем апоптоза. По результатам биопсии установлено, что у пациентов с классическим аутоиммунным диабетом типа 1 экспрессия FasL на β -клетках составляет 97%. Возрастающие концентрации IL-1 β и INF γ индуцируют экспрессию FasR и TNFR1 на β -клетках. Кроме того, FasL может поступать паракринно в виде растворимой формы FasL и при непосредственном контакте с FasL-несущими лимфоцитами. Это приводит к индукции специфических ферментов – каспаз, запускающих апоптоз [Колесник Ю. М., Орловский М. А., 2004] (табл. 1). При впервые выявленном СД1 отмечено снижение показателя FasR по сравнению с LADA. Это связывают с внутриклеточным дефицитом АТФ при СД1, что приводит к преобладанию некротической гибели β -клеток над апоптотической гибелью при СД1, в отличие от постепенно развивающегося аутоиммунного процесса при LADA с преобладанием апоптоза клеток островков Лангерганса [Дедов И.И. и соавт., 2005].

Изучение влияния цитокинов с противовоспалительными функциями показало, что IL-4 оказывает защитное действие при аутоиммунной

деструкции β -клеток у грызунов с аутоиммунным диабетом [Зак К.П., Попова В.В., 2006]. Преинкубация IL-4 с островковыми клетками поджелудочной железы человека полностью предотвращает апоптоз, вызываемый сочетанным действием IL-1, TNF α и IFN γ [Santangelo C. et al., 2001]. Выявленное повышение уровня IL-4 при LADA относят к одному из факторов, приводящих к отсутствию или снижению цитотоксичности Т-лимфоцитов и макрофагов, определяющих более медленное повреждение β -клеток поджелудочной железы [Симбирцев А.С., 2002, 2004] (табл. 1).

Таблица 1

Спектр цитокинопосредованных эффектов в поджелудочной железе [по данным С. Santangelo et al., 2001; А. Rabinovitch, 2003; Ю.М. Колесника, М.А. Орловского, 2004; С. Bruun et al., 2005; М. Chen et al., 2005]

Провоспалительные эффекты	Противовоспалительные эффекты
Прямое цитотоксическое воздействие	Снижение цитотоксичности иммунокомпетентных клеток
Влияние на экспрессию молекул адгезии	Стимуляция пролиферации Т-регуляторных лимфоцитов
Стимуляция продукции NO и цитокинов	Снижение пролиферации аутореактивных Т-лимфоцитов и распознавания аутоантигенов
Запуск программы апоптоза	Блокирование программы апоптоза

При оценке секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами крови у больных с впервые выявленным СД 1 типа установлено значительное снижение его продукции [Rapoport M.J. et al., 1998]. На основании экспериментальных исследований многие авторы относят IL-10 к цитокинам, оказывающим защитное действие при развитии СД1 типа [Rabinovitch A., 2003; Chang Y. et al., 2005]. В то же время в ряде работ при исследовании Т-клеток у NOD-мышей не было обнаружено противодиабетического действия IL-10, в отличие от IL-4 [Mi Q.S. et al., 2004].

На стадии предиабета и у недавно заболевших СД людей ряд исследователей отмечают повышение уровня IL-2 в плазме крови у

пациентов, а также значительное возрастание его продукции мононуклеарными лейкоцитами крови [Raporport M.J. et al., 1998, 2005; Зак К.П., Попова В.В., 2006]. Приводятся сообщения о снижении уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарными лейкоцитами у больных аутоиммунным диабетом (как СД1, так и LADA) [Marchase R.V. et al., 1999; Herold K.C. et al., 2003; Дедов И.И. и соавт., 2005]. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся циркулирующего рецептора IL-2 (CD25) весьма противоречивы. Так, наряду с данными о повышении его концентрации в периферической крови у больных СД1, в том числе в доклиническую стадию развития заболевания [Hussain M.J. et al., 1998], есть наблюдения и о снижении величины данного показателя [Giordano C. et al., 1993]. Кроме того, существуют фактические доказательства, указывающие на то, что повышение содержания растворимого рецептора к IL-2 характерно только для больных СД 1 с пролиферативной ретинопатией [Зак К.П., Попова В.В., 2006].

В последние годы появились работы, в которых предпринимались попытки определения иммунологических маркеров (помимо аутоантител), специфичных для тех или иных аутоиммунных тиреопатий. Так, выявлено, что у больных АИТ в сыворотке крови увеличен уровень IL-2, -12, -18 и IFN γ , по сравнению с таковым у больных БГ и здоровых лиц. Обнаружено снижение уровня IL-1 β у лиц с БГ и АИТ, по сравнению со здоровыми людьми [Phenekos C., 2004]. В то же время в работах отечественных авторов показано повышение уровня продукции IL-1 β , IL-6 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с АИТ и БГ (наиболее выраженное при АИТ), по сравнению с нормой. При АИТ также обнаружено повышение продукции TNF α [Глазанова Т.В. и соавт., 2004].

Весьма интересными, на наш взгляд, оказались результаты экспериментальных исследований по выяснению роли цитокинов в пролиферации, гибели и функциональной активности тиреоцитов. Так, на культуре тиреоцитов (крысы PCCL3, FRTL-5, а также фолликулярный

эпителий человека – интраоперационный материал) в присутствии цитокинов IL-1 α и IFN γ было показано, что IL-4 полностью предотвращает альтерацию ткани, вызванную совместным действием цитокинов IL-1 α и IFN γ , снижение функции тиреоцитов, определяемую по экспрессии тиреоглобулина и тиреоидной пероксидазы. Воздействие TGF β и IL-10 не оказывало блокирующего действия на эффекты сочетанного влияния IL-1 α и IFN γ . Было обосновано также, что IL-4 уменьшает депрессивные эффекты, вызванные IL-10, но не TGF β [Poncin S. et al., 2008].

В последние десятилетия предметом активного изучения при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы являлись механизмы апоптотической гибели тиреоцитов. Важным условием индукции Fas-опосредованного апоптоза тиреоидных клеток оказалось сочетанное воздействие на них IFN γ и TNF α [Bretz J.D., 2001]. Было установлено также, что экспрессию Fas-рецептора на клетках щитовидной железы способен индуцировать провоспалительный цитокин IL-1 β [Paolieri F., 1999].

На клеточных линиях тиреоцитов, полученных у животных и человека, было показано локальное взаимодействие различных цитокинов и их влияние на функционирование тиреоцитов. Оказалось, что цитокины Th1-профиля (IL-1, IFN γ) способны напрямую воздействовать на клетки ЩЖ через рецепторы, расположенные на тиреоцитах. Они подавляют экспрессию специфических для ЩЖ белков, таких как тиреоглобулин, тиреопероксидаза, Na/I симпортер (NIS). В связи с этим высказывается предположение, что гипотиреоз, сопровождающий АИТ, развивается не только в результате апоптоза тиреоцитов, но и в результате снижения функции ЩЖ без клеточной деструкции [Poncin S. et al., 2008].

Исследованиями последних лет доказана роль IL-10 и CD8⁺-клеток в разрешении аутоиммунных тиреопатий. Показано, что снижение продукции IL-10 и количества CD8⁺-лимфоцитов ведет к увеличению инфильтрации ткани железы, продукции провоспалительных цитокинов, активации апоптоза клеток тиреоидного эпителия и угнетению апоптоза CD4⁺-

лимфоцитов. В случае увеличения продукции IL-10 и количества CD8⁺-клеток ингибируется эффекторная фаза иммунного ответа, происходит разрешение воспалительного ответа через Fas-FasL-механизм, что способствует выживанию тиреоцитов [Fang Y. et al., 2008].

Особенность аутоиммунного воспаления щитовидной железы заключается в том, что фолликулярный эпителий не только отвечает на действие цитокинов, источниками которых являются моноциты и лимфоциты, мигрирующие в ЩЖ из кровяного русла, но и самостоятельно продуцирует определенные цитокины. Тиреоциты способны синтезировать *in vitro* IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , TGF β , IL-16, CXCL-19, CXCL-10 и RANTES [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002; Weetman A.P., 2004]. В культуре тиреоцитов также установлена секреция хемокина CXCL-10 в ответ на воздействие IFN γ и TNF α . Рецептором CXCL-10 является CXCR3, экспрессирующийся на лимфоцитах и эндотелиальных клетках в больших количествах. Это служит одним из механизмов формирования лимфоидной инфильтрации ЩЖ. Показано, что уровень сывороточного CXCL-10 увеличивается у пациентов с БГ [Gianoukakis A.G. et al., 2008].

Цитокины IL-1, IFN γ и TNF α стимулируют *in vitro* продукцию цитокинов фолликулярными клетками ЩЖ, что может иметь значение в механизмах увеличения инфильтрации железы *in vivo*. Цитокины индуцируют экспрессию молекул адгезии на фолликулярных клетках ЩЖ, а также стимулируют продукцию NO и простагландинов этими клетками, что также имеет значение в локализации и усилении воспалительного процесса [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002] (табл. 2).

Перекрестное взаимодействие между тиреоцитами и лимфоцитами, инфильтрирующими паренхиму ЩЖ, может происходить через различные сигнальные пути. В частности, задействована молекула CD40, член суперсемейства рецептора TNF α , способствующая активации В-лимфоцитов. Повышение уровня CD40 было выявлено при БГ, что явилось триггером избыточной продукции IL-10 и активации гуморального звена иммунитета

[Itoh M. et al., 2000]. При этом в культурах тиреоидных клеток CD40 способствовал увеличению продукции IL-6 [Gianoukakis A.G. et al., 2008].

Таблица 2

Спектр цитокиноопосредованных эффектов в щитовидной железе
[по данным A.P. Weetman, R.A. Ajjan, 2002]

Провоспалительные эффекты	Противовоспалительные эффекты	Функциональные эффекты
Влияние на экспрессию HLA I и II класса	Влияние на экспрессию HLA I и II класса	Модуляция скорости пролиферации фолликулярного эпителия
Влияние на экспрессию молекул адгезии	Защита от клеточно-опосредованной цитотоксичности	Снижение экспрессии гена NIS, захвата и органификации йода
Стимуляция продукции простагландинов, NO и цитокинов	Защита от комплемент-зависимой цитотоксичности	Уменьшение экспрессии ТПО и рецептора к ТТГ
Запуск программы апоптоза	Снижение пролиферации Т-лимфоцитов и распознавания ауто-антигенов	Уменьшение продукции тиреоглобулина и органификации йода

Известно также, что при аутоиммунной патологии щитовидной железы усиление антигенспецифической стимуляции В-лимфоцитов и продукция специфических иммуноглобулинов против различных компонентов фолликулярного эпителия железы происходит под действием цитокинов IL-5, IL-10 и IL-4 [Парахонский А.П., 2005].

Безусловно, важную роль в развитии аутоиммунных тиреопатий играет IL-2. Данные литературы в достаточной мере описывают его участие в процессах пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, индукции цитолитической активности эффекторных Т- и НК-клеток, стимуляции клональной пролиферации В-лимфоцитов, увеличении синтеза плазматическими клетками антител к антигенам ЩЖ [Ajjan R.A., 1996; Furtado G., 2002; Gianoukakis A. et al., 2008; Sakaguchi S. et al., 2008]. Однако

влияние интратиреоидной продукции IL-2 на состояние фолликулярного эпителия при АИТ и БГ раскрыто недостаточно.

Таким образом, из представленных выше данных видно, что в настоящее время идет накопление, иногда достаточно противоречивых, клинических и экспериментальных данных относительно участия различных цитокинов в патогенезе аутоиммунных эндокринопатий. При этом часто указывается на то, что в основе их патогенеза лежат нарушения соотношения Th-клонов лимфоцитов и, следовательно, дизрегуляция продукции и взаимодействия секретируемых иммунокомпетентными клетками цитокинов. В то же время при анализе данных литературы обнаруживается, что аутоиммунный тиреоидит и аутоиммунный сахарный диабет, связанные с быстрой потерей гормонпродуцирующей функции желез, характеризуются схожим спектром преобладающих цитокинов. Подобные параллели прослеживаются также между латентной формой аутоиммунного диабета и болезнью Грейвса. Однако механизмы дисбаланса цитокинового каскада при формировании и прогрессировании заболеваний щитовидной и поджелудочной желез аутоиммунного генеза до настоящего времени полностью не раскрыты.

Заключение

Аутоиммунные эндокринопатии различной локализации характеризуются специфическими механизмами взаимодействия иммунокомпетентных клеток и имеющих антигенные структуры клеток органа-мишени. Формирование определенного окружения из антигенпредставляющих клеток и клонов аутореактивных лимфоцитов, их функционирование тесно связано с продукцией цитокинов как иммунными клетками, так и клетками эндокринных желез. В то же время спектр и концентрация цитокинов, а также способность клеток воспринимать от них сигнал через специфические рецепторы во многом определяют характер течения аутоиммунных эндокринопатий. Существующие данные указывают

на ряд закономерностей, связанных с деструктивным или протективным влиянием на клетки-мишени некоторых цитокинов, а также зависимостью между функциональным состоянием эндокринной железы и преобладающим типом иммунного ответа (Th1- или Th2-зависимого иммунного ответа).

Углубленное изучение процессов продукции цитокинов, рецепторпрезентирующей способности иммунокомпетентных клеток крови и их кооперации, по нашему мнению, позволит детализировать существующие на сегодняшний день сведения о патогенезе аутоиммунных эндокринопатий различной локализации, уточнить ряд спорных, с позиции анализа накопленного к настоящему времени фактического материала, вопросов о механизмах развития эндокринопатий аутоиммунного генеза, а также определить новые подходы к выбору патогенетически обоснованной терапевтической стратегии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика обследованных лиц

В работе приведены результаты комплексного обследования 209 пациентов (96 мужчин и 113 женщин) в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст – $43,4 \pm 5,8$ 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, Заслуженный врач России В.М. Шевелев, заведующая клиникой – врач высшей квалификационной категории Т.К. Гудкова). Клинические группы были сформированы при непосредственном участии доцента кафедры эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России канд. мед. наук Т.В. Саприной.

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

Критериями исключения пациентов из программы исследования являлись: возраст – свыше 55 лет, наличие на момент обследования острых форм и обострения хронических форм заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза, анамнестически и клинически установленное наличие аллергических болезней (бронхиальная астма, атопический дерматит и тд.), вакцинация менее чем за 2 месяца до момента обследования, переливание крови в течение последних 8-ми недель, пероральное или парентеральное применение кортикостероидов (более 7 дней лечения подряд)

в течение 4 недель до обследования, употребление психоактивных веществ в анамнезе, а также отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие).

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/м^2 , с верифицированным отсутствием нарушений углеводного обмена и заболеваний щитовидной железы, с отсутствием диагностически значимых концентраций в крови аутоантител к структурам инсулярного аппарата поджелудочной железы и фолликулярного эпителия щитовидной железы, не имевших в анамнезе или на момент обследования аллергических болезней (бронхиальная астма, атопический дерматит и тд.).

Критериями исключения здоровых добровольцев из программы исследования явились: возраст – свыше 55 лет, пероральное или парентеральное применение кортикостероидов (более 7-ми дней лечения подряд) в течение 4 недель до обследования, вакцинация менее чем за 2 месяца до момента обследования, употребление психоактивных веществ в анамнезе, а также отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие).

Исследование выполнено на базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (научный руководитель – д-р мед. наук, профессор Н.В. Рязанцева).

Исследование соответствовало требованиям локального этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1197, дата проведения заседания – 23 ноября 2009 г.), разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России № 266 от 19.06.2003 г.

2.1.1 Клиническая характеристика пациентов с сахарным диабетом

Для идентификации роли нарушений системы цитокинов и их рецепторов в патогенезе эндокринопатий аутоиммунного генеза в соответствии со сформулированными в диссертационной работе целью и задачами нами было проведено обследование 135 пациентов (63 мужчины и 72 женщины, средний возраст – $41,1 \pm 1,0$ лет) с сахарным диабетом, включая 37 лиц с СД1, 31 – с LADA, а также 67 пациентов с СД2.

Диагноз сахарного диабета во всех группах был поставлен согласно диагностическим критериям СД и других нарушений углеводного обмена (ВОЗ, 1999 г.). При наличии клинических симптомов, указывающих на СД (полидипсия, полиурия, снижение массы тела, кетоз и/или кетоацидоз), диагноз подтверждался при оценке гликемического профиля, в котором выявлялся уровень глюкозы в плазме крови выше 7,0 ммоль/л – натощак, выше 11,1 ммоль/л – через 2 ч после приема пищи. При отсутствии симптомов СД (характерно для пациентов с СД2) диагноз верифицировался в ходе проведения стандартного теста толерантности к глюкозе (содержание глюкозы в плазме крови 7,0 ммоль/л – натощак, выше 11,1 ммоль/л – через 2 ч после нагрузки глюкозой).

В группу пациентов с СД1 с манифестным течением заболевания были включены 24 мужчины и 13 женщин (средний возраст – $30,5 \pm 1,2$ лет). Диагноз СД1 (шифр МКБ – E.10) устанавливался на основании развития кетоацидоза в течение первых 6 мес от начала заболевания, персистирующей потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза для достижения стабильной метаболической компенсации.

Другую группу составили пациенты с LADA (12 мужчин и 19 женщин, средний возраст – $41,4 \pm 2,1$ лет). 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. В качестве клинических критериев диагноза LADA также использовались: индекс массы тела (ИМТ) – менее 25 кг/м², 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 Ед/мл, к инсулину >10 Ед/мл, наличие антител к клеткам островков Лангерганса при качественном определении).

Группой сравнения для обследованных пациентов с СД1 и LADA служили 67 человек с диагнозом СД2 (шифр МКБ – E.11), прошедшие первоначальный клинический и лабораторный скрининг (40 женщин и 27 мужчин, средний возраст – 46,8±1,1 лет). Диагноз СД2 устанавливался на основании наличия маркеров метаболического синдрома, постепенного развития заболевания без кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес от начала заболевания.

Все группы пациентов с СД были сопоставимы по уровню гликированного гемоглобина (HbA_{1c} равен 8,4; 8,6 и 8,4 % при СД1, LADA и СД2, соответственно, $p>0,05$), что позволило исключить влияние различий в уровне метаболического контроля заболевания на изучаемые в работе иммунологические показатели.

Каждая группа пациентов с сахарным диабетом была разделена на подгруппы в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет), наличия микроангиопатий (диабетическая ретинопатия, нефропатия). Диабетическая ретинопатия диагностировалась по результатам

офтальмоскопии (данные фундоскопического исследования после расширения зрачка). Диабетическую нефропатию верифицировали по выявлению микроальбуминурии (уровень альбумина в моче от 30 до 300 мг в сутки), протеинурии (содержание белка в моче более 300 мг в сутки). В программу исследования были включены пациенты с микроальбуминурией и умеренной протеинурией (содержание белка в моче не превышало 1 г/сут).

Разделение пациентов по стажу заболевания связано, с одной стороны, необходимостью исключения из программы исследования пациентов с макроангиопатиями, появление которых отмечалось после 10-го года заболевания, а, с другой стороны, выявленными в ходе исследования гормонально-метаболическими закономерностями течения СД1, LADA и СД2 (рис. 2, 3).

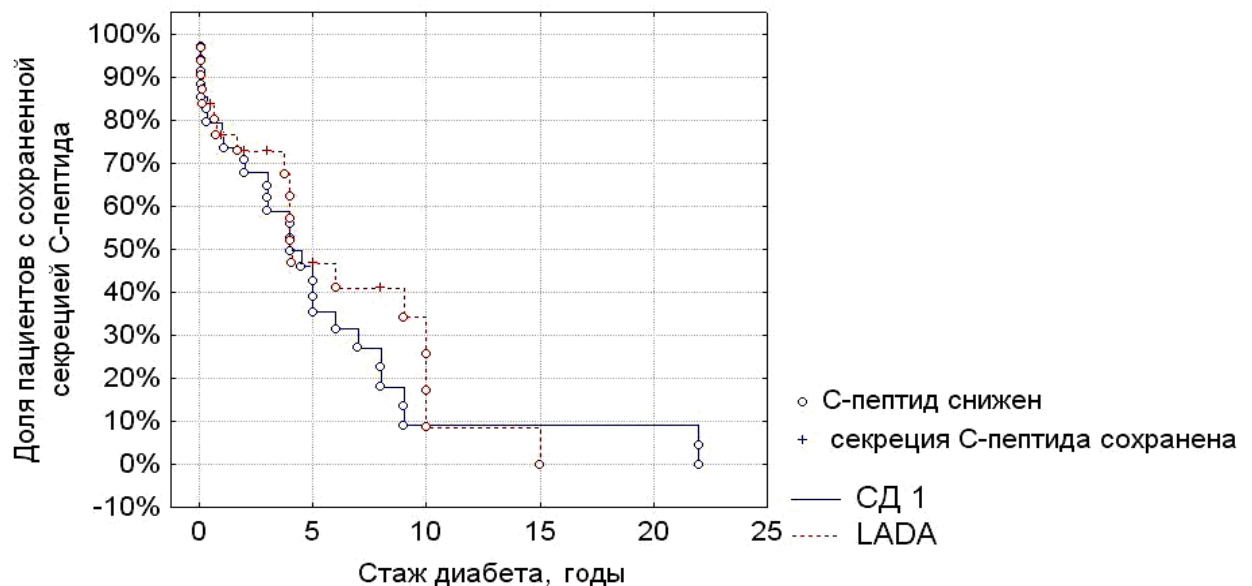


Рис. 2. Динамика концентрации С-пептида натощак в сыворотке крови у больных СД1 и LADA в зависимости от стажа заболевания

Известно, что концентрация С-пептида в сыворотке крови является показателем, отражающим продукцию инсулина β -клетками островков Лангерганса и, следовательно, их функциональную активность. Так, при стаже диабета до 4 лет значения уровня базального С-пептида в сыворотке крови у пациентов с LADA соответствовали величине показателя при СД2 и, в то же время, были выше, чем у больных СД1. Однако после 4 лет

заболевания базальная концентрация С-пептида у пациентов с LADA сравнивалась с аналогичным показателем у пациентов с СД1, кроме того, отмечалась тенденция к более низкой базальной секреции С-пептида при LADA по сравнению с таковой у пациентов с СД 2 (рис.2, 3).

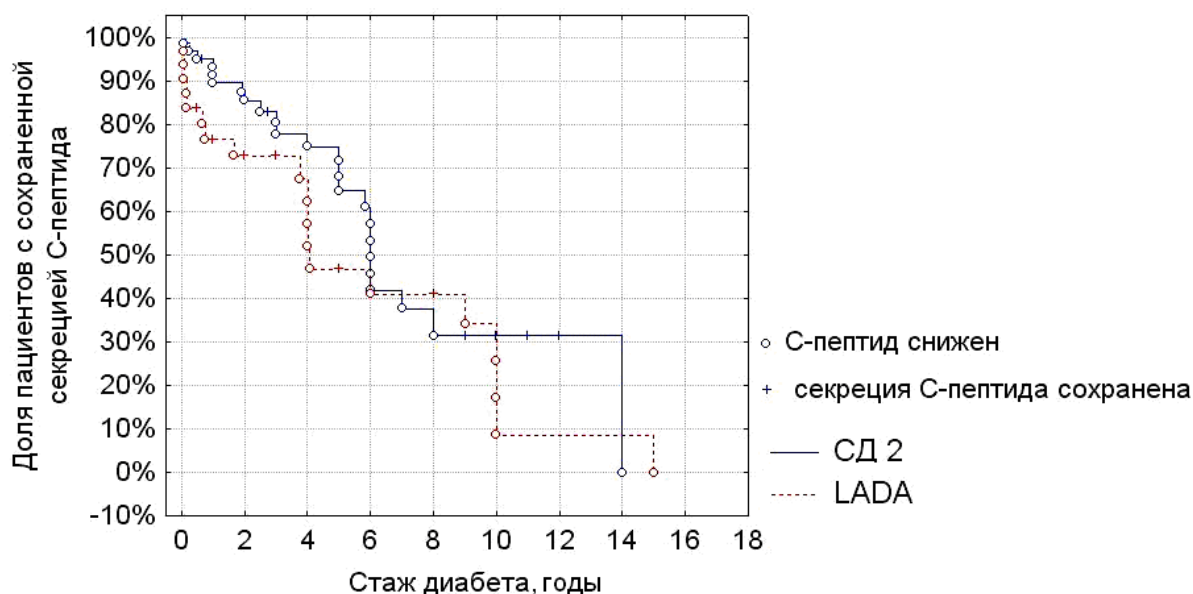


Рис. 3. Динамика концентрации С-пептида натощак в сыворотке крови у больных СД 2 и LADA в зависимости от стажа заболевания

Базальная концентрация (Ме (Q₁-Q₃)) С-пептида при стаже заболевания менее 4-х лет у пациентов с СД1 составила 0,64 (0,28-0,78) нг/мл, у пациентов с LADA – 0,96 (0,86-2,31) нг/мл, а при СД2 – 1,54 (0,79-3,26) нг/мл (референтные значения у здоровых лиц согласно инструкции применяемой тест-системы «AccuBind», США – 0,7-1,9 нг/мл). В случае, когда стаж диабета превышал 4 года, определялись следующие значения базальной концентрации С-пептида: СД1 – 0,24 (0,15-0,95) нг/мл, LADA – 0,31 (0,15-0,91) нг/мл, СД2 – 0,94 (0,28-2,39) нг/мл.

Приведенные результаты исследований указывают на необходимость учета стажа заболевания в диапазонах до 4-х лет и 4-10 лет, так как продукция инсулина и функциональный резерв β-клеток относятся к факторам, способным оказывать влияние на изученные в работе иммунологические показатели.

Так, в подгруппу пациентов со стажем диабета до 4-х лет были включены 21 человек (16 мужчин, 5 женщин, средний возраст – $29,3 \pm 6,5$ лет) с СД1, 22 пациента (9 мужчин, 13 женщин, средний возраст – $37,8 \pm 6,5$ лет) – с LADA и 45 больных (21 мужчин, 24 женщины, средний возраст – $45,6 \pm 2,4$ лет) – с СД2. Стаж заболевания 4-10 лет имели 16 пациентов (8 мужчин, 8 женщин, средний возраст – $32,1 \pm 7,85$ лет) с СД1, 9 (3 мужчин, 6 женщин, средний возраст – $50,0 \pm 1,5$ лет) – с LADA и 22 (6 мужчин, 16 женщин, средний возраст – $49,2 \pm 2,7$ лет) – с СД2.

С учетом наличия микроангиопатий пациенты распределились следующим образом (табл. 3).

Таблица 3

Распространенность (%) ретинопатии и нефропатии у обследованных пациентов с сахарным диабетом

Обследованные больные		Тип сахарного диабета		
		СД 1 (n=37)	LADA (n=31)	СД 2 (n=67)
Без осложнений		48,7 (n=18)	38,8 (n=12)	26,9 (n=18)
С ретинопатией	С непролиферативной ретинопатией	18,9 (n=7)	32,2 (n=10)	38,8 (n=26)
	С пре- и пролиферативной ретинопатией	5,4 (n=2)	3,2 (n=1)	1,5 (n=1)
С нефропатией	В стадии микроальбуминурии	24,3 (n=9)	19,3 (n=6)	31,3 (n=21)
	В стадии протеинурии	2,7 (n=1)	6,5 (n=2)	1,5 (n=1)

Примечание: n – количество пациентов

Группу пациентов без микроангиопатий с диагнозом СД1 составили 18 человек (11 мужчин, 7 женщин; средний возраст – $31,2 \pm 2,4$ лет), с LADA – 12 человек (5 мужчин, 7 женщин; средний возраст – $43,4 \pm 1,8$ лет) и СД2 – 18 пациентов (7 мужчин, 11 женщин; средний возраст – $46,5 \pm 3,0$ лет). По факту наличия микроангиопатий (как диабетической ретинопатии, так и нефропатии) в группу пациентов с СД1 были включены 19 человек (13 мужчин, 6 женщин; средний возраст – $35,7 \pm 5,0$ лет), в группу больных LADA – 19 человек (7 мужчин, 12 женщин; средний возраст – $47,3 \pm 7,7$ лет). Среди пациентов с СД2 микроангиопатии отмечались у 49 человек (20 мужчин, 29 женщин; средний возраст – $48,6 \pm 4,5$ лет).

В рассмотренной выборке пациентов с СД1 стаж заболевания, при котором появлялись микроангиопатии, составил $8,0 \pm 2,0$ лет. У больных LADA развитие микроангиопатий обнаруживалось лишь после 4-го года заболевания (табл. 4).

Таблица 4

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

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

Примечание: p_{1-2} – уровень статистической значимости различий значений показателя 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

Сопоставление данных о наличии микроангиопатий и функциональном состоянии β -клеток поджелудочной железы позволило выявить, что снижение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (как и при СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий (табл. 5).

Таблица 5

Базальная концентрация С-пептида в сыворотке крови у больных сахарным диабетом в зависимости от наличия микроангиопатий (Ме (Q₁-Q₃))

Тип сахарного диабета	С-пептид при отсутствии микроангиопатий, нг/мл	С-пептид при наличии микроангиопатий, нг/мл	Достоверность
СД1	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
СД2	2,31 (1,00-3,39)	0,83 (0,26-1,76)	p=0,01

Примечание: p – уровень статистической значимости различий значений показателя по сравнению с показателем в группе пациентов без микроангиопатий

2.1.2 Клиническая характеристика пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

В рамках проведенного диссертационного исследования нами была сформирована группа пациентов (74 человека, из них – 33 мужчины и 41 женщина, средний возраст – 42,2±1,4 года) с тиреопатиями аутоиммунного генеза (рис. 4). Больные были разделены на группы 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±1,2 года) с АИТ, вторую группу составили 45 пациентов (21 мужчин, 24 женщины, средний возраст – 42,9±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 мужчин, 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 пациентов с БГ – $2,6 \pm 1,5$ года. Состояние эутиреоза у пациентов с АИТ было достигнуто путем приема 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. Диагноз АИТ верифицировался на основании клинической картины, данных физикального обследования, наличия характерных ультрасонографических признаков, выявления в сыворотке крови у больных повышенного титра антитиреоидных антител (антитела к тиреопероксидазе >30 МЕ/мл и (или) тиреоглобулину >150 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 (T_3) и тироксина (T_4) (референтные значения для T_3 – $1,08-3,14$ пмоль/л; T_4 – $12,0-26,0$ пмоль/л).

При диагностике БГ обращалось внимание на наличие характерных жалоб и клинической картины тиреотоксикоза, данных физикального обследования, обнаружение характерных ультрасонографических признаков, наличие в сыворотке крови у больных повышенного титра антитиреоидных антител (антитела к тиреопероксидазе >30 МЕ/мл и (или) тиреоглобулину >150 МЕ/мл, к рецептору ТТГ $>1,5$ Ед/л), характерных изменений гормонального статуса (низкий уровень ТТГ ($<0,3$ мМЕ/л) в сочетании с повышенной концентрацией свободных фракций T_3 и T_4).

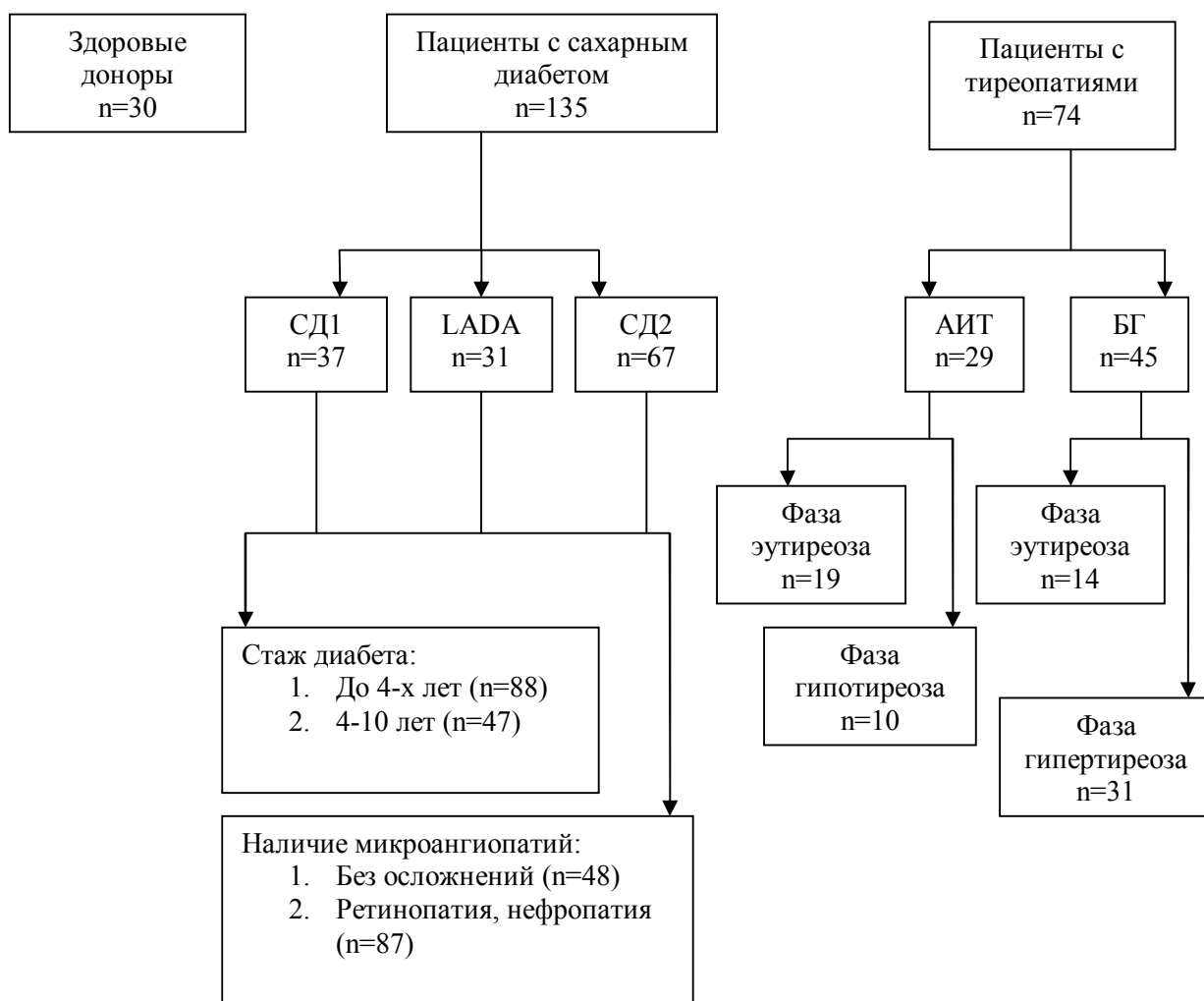


Рис. 4. Стратификация клинических групп

2.2 Методы исследования

Для изучения общих закономерностей и особенностей цитокинопосредованных механизмов дисрегуляции иммунной системы при аутоиммунных эндокринопатиях были использованы следующие методы исследования.

1. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови (проточная лазерная цитофлуориметрия).
2. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови.
3. Определение концентраций цитокинов (IL-2, IL-4, TNF α) в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов крови (иммуноферментный анализ).

4. Оценка презентации мембранно-связанных рецепторов (CD25, CD124, CD120) на лимфоцитах крови (проточная лазерная цитофлуориметрия) и концентрации растворимой формы рецептора (sTNF-R1) в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов крови (иммуноферментный анализ).

5. Определение концентрации органоспецифических антител к поджелудочной и щитовидной железам (иммуноферментный анализ).

Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 6.

Материалом для данных исследований являлась венозная кровь, стабилизированная этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА), взятая в вакуумные пробирки «BD Vacutainer» (Becton Dickinson, США) 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 «BD Vacutainer» с активатором свертывания кремнеземом (Becton Dickinson, США), центрифугировали пробирки 5 мин при 400 g (1500 об/мин).

2.2.1 Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови

Цельную венозную кровь, стабилизированную ЭДТА, в объеме 50 мкл помещали в пробирку для проточной лазерной цитофлуориметрии. Добавляли 5 мкл меченых моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56^{low} («BD Multitests 6 color TBNK», США), ресуспендировали с помощью вортекса и инкубировали 15 мин в условиях темноты при комнатной температуре. После этого в образцы добавляли 500 мкл лизирующего буфера («BD Biosciences», США), пробу ресуспендировали с помощью вортекса и инкубировали в течение 15 мин в условиях темноты при комнатной температуре.

Таблица 6

Распределение здоровых доноров и обследованных больных в соответствии с использованными методами исследования

№	Методы исследования	Обследованные лица					
		Здоровые доноры	Больные сахарным диабетом			Больные аутоиммунными тиреопатиями	
			Пациенты с сахарным диабетом 1 типа	Пациенты с латентным аутоиммунным диабетом взрослых	Пациенты с сахарным диабетом 2 типа	Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом	Пациенты с болезнью Грейвса
1	Определение количества лимфоцитов крови, презентующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56 ^{low} , методом проточной лазерной цитофлуориметрии	30	37	31	67	29	45
2	Определение концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови цитокинов (IL-2, IL-4, TNF α) и растворимой формы рецептора к TNF α с использованием иммуноферментного анализа	30	37	31	67	29	45
3	Определение количества рецептор-презентирующих (CD25, CD124, CD120) лимфоцитов крови методом проточной цитофлуориметрии	30	37	31	67	29	45
4	Определение концентрации аутоантител к поджелудочной железе (антитела к поверхностному антигену β -клетки, к декарбоксилазе глутаминовой кислоты, к инсулину) методом иммуноферментного анализа	30	37	31	98	Не проводилось	Не проводилось
5	Определение концентрации аутоантител к щитовидной железе (антитела к тиреоидной пероксидазе, к рецептору тиреотропного гормона) методом иммуноферментного анализа	30	Не проводилось	Не проводилось	Не проводилось	29	45

Измерения проводили на проточном цитометре FacsCanto II («Becton Dickinson», США) посредством оценки интенсивности свечения красителей с помощью автоматического программного обеспечения FacsCanto II. При расчетах учитывали показатели малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, а также бокового светорассеяния (SSC), отражающего цитоплазматические и мембранные особенности клетки [Пинегин Б. В. и соавт., 2001]. Результаты выражали в процентах (%) и абсолютных значениях.

Абсолютное и относительное содержание общего количества лимфоцитов, а также абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов определяли с помощью стандартных гематологических методов [Сисла Б., 2011].

2.2.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови

Мононуклеарные лейкоциты крови выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980].

Венозную кровь, стабилизированную ЭДТА, выдерживали при температуре 37°C в течение 40–60 мин для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму 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).

Для оценки жизнеспособности клеток 0,1 мл суспензии мононуклеарных лейкоцитов смешивали с равным объемом 0,5% трипанового синего («Serva», США), заполняли счетную камеру Горяева.

Концентрацию клеток рассчитывали по формуле:

$$X=A \cdot K \cdot 10^4 \text{ (клеток/мл)},$$

где A – количество клеток в 20-ти больших квадратах камеры; K – коэффициент разведения.

Результаты оценивали по содержанию клеток, окрашенных в синий цвет. Культуру мононуклеарных лейкоцитов считали жизнеспособной, если количество окрашенных в синий цвет клеток не превышало 5-7% [Гольдберг Е.Д и соавт., 1992].

2.2.3 Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови

Суспензию мононуклеарных лейкоцитов крови вносили во флаконы в количестве $2 \cdot 10^6$ на 1 мл, добавляли полную культуральную среду, состоящую из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина. Клетки инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов [Тотолян А.А. и соавт., 2002]. После инкубации клетки переносили в пробирку, центрифугировали в течение 10 мин при 400 g (1500 об/мин) для их осаждения. Полученный супернатант использовали для определения концентрации IL-2, TNF α и IL-4.

2.2.4 Методы оценки системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α

2.2.4.1 Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови

Содержание цитокинов (IL-2, IL-4, TNF α) в супернатантах клеточных культур проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) наборами производства «ВекторБест» (Россия) согласно рекомендации производителя тест-системы.

Во все ячейки микропланшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, в ячейки микропланшета A1-F1 вносили по 100 мкл разведений калибровочных растворов с известными концентрациями цитокинов (IL-2 – 0-500 пг/мл, IL-4 – 0-100 пг/мл, TNF α – 0-250 пг/мл), в лунку G1 – 100 мкл контрольного образца. В оставшиеся ячейки вносили по 100 мкл исследуемых образцов. Через 2 ч инкубации при 37°C и непрерывном встряхивании удаляли жидкость из ячеек, 5 раз промыв их буфером, после чего проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Далее в каждую лунку вносили необходимое для анализа количество конъюгата № 1 (антивидовые поликлональные антитела) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и непрерывном встряхивании. После пяти циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости вносили во все лунки конъюгат №2 (пероксидаза хрена, связанная со стрептавидином), инкубировали 30 мин при 37°C в условиях непрерывного встряхивания. После окончания инкубации планшет промывали 5 раз, проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Затем во все лунки добавляли по 200 мкл раствора субстрата с красителем. Подготовленные пробы инкубировали 25 мин при 20°C в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Наблюдали развитие голубой окраски. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента (0,5 М серная кислота) в каждую лунку.

Учет интенсивности окраски проводили с использованием фотометра для микропланшетов «Multiscan EX», («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию IL-2, IL-4 и TNF α в культуральных средах рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.4.2 Определение концентрации растворимого рецептора к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови

Оценку содержания растворимого рецептора первого типа к TNF α (sTNF-R1) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA)

(«BenderMedSystems», Австрия) согласно инструкции, прилагаемой производителем тест-системы.

В ячейки микропланшета A1-G1 вносили по 100 мкл разведений калибровочных растворов sTNF-R1 (0,08-5,00 нг/мл). В ячейку H1 помещали 100 мкл раствора для разведения образцов. В оставшиеся ячейки вносили по 10 мкл исследуемых супернатантов культур мононуклеарных лейкоцитов крови и 90 мкл раствора для разведения образцов. Затем добавляли заранее подготовленный рабочий раствор конъюгата в объеме 50 мкл. Планшет инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре (18-25°C) в условиях непрерывного встряхивания (100 об/мин). После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости вносили во все лунки по 100 мкл раствора субстрат-хромогенного комплекса и инкубировали планшет 10 мин при комнатной температуре в темноте. По окончании времени инкубации жидкость в лунках окрашивалась в голубой цвет. Для остановки реакции во все ячейки добавляли стоп-реагент (1 М фосфорная кислота).

Регистрацию результатов проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) на основе измерения оптической плотности образцов при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке H1, в которой отсутствовал sTNF-R1. Концентрацию sTNF-R1 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.4.3 Определение количества лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-2, IL-4 и TNF α

В пробирки вносили 5 мкл фикоэритрин-меченных моноклональных антител к IL-2-рецептору (CD25-PE), IL-4-рецептору (CD124-PE) и TNF-R1 (CD120 α -PE) («Beckman Coulter», Франция), добавляли 50 мкл цельной венозной крови, стабилизированной ЭДТА, и ресуспендировали с помощью вортекса. После 15 мин инкубации в темноте при комнатной температуре в пробы вносили 500 мкл лизирующего буфера («BD Biosciences», США), после чего

пробу ресуспендировали с помощью вортекса. После инкубации пробы центрифугировали в течение 5 мин при 400 g (1500 об/мин), удаляли супернатант аспирацией и ресуспендировали образцы в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (pH=7,4).

Анализировали параметры оранжевой ($\lambda=585$ нм) флюоресценции в гейте лимфоцитарных клеток на проточном цитометре FACS Canto II («Becton Dickinson», США) и на ее основе определяли относительное количество клеток, несущих на своей поверхности рецепторы к цитокинам IL-2, IL-4, TNF α . Результаты выражали в процентах (%).

2.2.5 Оценка концентрации органоспецифических антител к поджелудочной и щитовидной железам

2.2.5.1 Оценка концентрации аутоантител к инсулярному аппарату поджелудочной железы

Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем, определяли уровень циркулирующих в крови антител к инсулину (IAA) («Orgentec», Германия), к поверхностному антигену β -клетки (ICA) и декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD) («Biomerica», США).

Для установления уровня аутоантител в лунки микропланшета A1-F1 – при определении IAA (B1-F1 – при определении GAD) добавляли 100 мкл калибраторов (0-100 Ед/мл для IAA; 0,5-3 Ед/мл для GAD), положительного и отрицательного контрольного образца, а также в лунки B1-D1 при определении ICA вносили 100 мкл положительного, референсного и отрицательного контрольного образца (оставляя лунку A1 при определении ICA и GAD свободной). В оставшиеся ячейки вносили 100 мкл образцов исследуемых сывороток крови, предварительно разбавленных в 100 раз буфером для разведения проб. Инкубировали планшет 1 ч (30 мин для IAA) при температуре 25°C, после чего промывали его 3 раза по 300 мкл промывочным буфером и просушивали фильтровальной бумагой. Во все

лунки (за исключением ячейки A1 при определении ICA и GAD) вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и инкубировали микропланшет в темноте в течение 1 ч (15 мин для IAA) при комнатной температуре ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). По окончании инкубации планшет 3 раза промывали по 300 мкл промывочным буфером и просушивали фильтровальной бумагой. Затем быстро вносили во все ячейки по 100 мкл раствора субстрата (ТМБ). После 30-ти (15-ти для IAA) минутной инкубации в темноте при температуре 25°C останавливали реакцию путем внесения в лунки планшета 50 мкл стоп-реагента (1N NaOH) (100 мкл стоп-раствора (10% раствор фосфорной кислоты) с последующей 5-ти минутной инкубацией при определении IAA).

Регистрацию результатов проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) по измерению оптической плотности образцов при длине волны 405 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке «бланк» (A1) при определении ICA и GAD, и при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке с концентрацией калибратора равной нулю (A1) при определении IAA. Концентрацию антител в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Уровень ICA выражали в единицах оптической плотности (ОП).

2.2.5.2 Оценка концентрации аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы

Концентрацию антител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО) и к рецептору тиреотропного гормона (анти-rTТГ) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью тест-систем производства «DRG» (Германия).

При количественном определении антител к ТПО в лунки микропланшета (A1-H1) добавляли 100 мкл калибраторов (0-3000 МЕ/мл), положительного и отрицательного контрольного образца. В оставшиеся ячейки вносили 100 мкл образцов исследуемых сывороток крови, предварительно разбавленных в 100 раз буфером для разведения проб.

Планшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре (20-28°C), после чего удаляли содержимое лунок и промывали их 3 раза 300 мкл промывочного раствора. Раскапывали во все лунки 100 мкл раствора ферментного конъюгата и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. После 3-х циклов промывки 300 мкл промывочного раствора добавляли в ячейки планшета 100 мкл хромогенного субстрата, содержащего ТМБ. Через 15 мин инкубации при комнатной температуре в лунки вносили 100 мкл стоп-реагента (1 М соляная кислота) и оставляли планшет на 5 мин для стабилизации развития окрашивания.

Для определения уровня антител к рецептору тиреотропного гормона в лунки планшета (за исключением G1) вносили 75 мкл старт-буфера. В ячейки A1-F1 добавляли калибраторы (1-40 Ед/л), положительный и отрицательный контрольные образцы, в остальные – образцы исследуемых сывороток крови, оставляя свободной лунку G1. Планшет инкубировали 2 ч при комнатной температуре (20-25°C) в условиях непрерывного встряхивания (500 об/мин). После инкубации планшет промывали 2 раза 300 мкл промывочного раствора. Вносили в лунки (за исключением G1) 100 мкл вторичные биотинилированные антитела и инкубировали 25 мин при комнатной температуре без встряхивания планшета, после чего промывали планшет 2 раза 300 мкл промывочного раствора. Вносили 100 мкл рабочего раствора стрептавидин-связанной пероксидазы, инкубировали 20 мин при комнатной температуре без встряхивания планшета и повторяли процедуру отмывки (промывали 2 раза 300 мкл промывочного раствора). Затем во все лунки планшета добавляли субстрат для пероксидазы (ТМБ) и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре без встряхивания планшета. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-реагента и встряхиванием планшета в течение 5 сек.

Регистрацию результатов проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) по измерению оптической плотности образцов с использованием светофильтра

450 нм, устанавливая нулевое поглощение для анти-ТПО по лунке с концентрацией калибратора равной нулю (A1) и по лунке G1 (бланк) при измерении анти-рТТГ. Концентрацию антител к ТПО и рТТГ в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой. Результаты выражали в МЕ/л для концентрации антител к ТПО и в Ед/л – для антител к рецептору тиреотропного гормона.

2.2.6 Статистический анализ результатов исследования

Для каждой выборки рассчитывали медиану (Me), интерквартильный размах (Q1-Q3). Для проверки нормальности распределения величин показателей использовали критерий Колмогорова–Смирнова. 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 при уровне значимости $p < 0,05$ [Гланц С., 1998]. 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].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Фенотипическая характеристика лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями

Предварительный статистический анализ результатов исследования показал отсутствие достоверных внутригрупповых различий ($p > 0,05$) значений показателей, отражающих фенотип лимфоцитов, а также значений продукции IL-2, IL-4, TNF α и состояния комплементарных им рецепторов на лимфоцитах крови, у здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями в зависимости от пола и возраста лиц, принявших участие в исследовании, что позволило скомпоновать группы обследованных лиц, исходя сугубо из клинических особенностей течения патологического процесса (рис. 4).

3.1.1 Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза

У пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза было проведено сравнение значений показателей в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет), а также наличия микроангиопатий (ретинопатия, нефропатия), не выявившее статистически значимых различий ($p > 0,05$). 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.

Общее количество лимфоцитов в крови у пациентов с СД1 ($p = 0,025$), LADA ($p = 0,004$) и СД2 ($p = 0,001$) оказалось достоверно ниже такового у здоровых доноров. Достоверных различий в относительном содержании лимфоцитов у пациентов обследованных клинических групп обнаружено не было (табл. 7).

При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов с различными вариантами аутоиммунного сахарного диабета были получены следующие результаты (табл. 7).

Содержание лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом (Ме (Q₁-Q₃))

Показатель		Здоровые доноры (n=30)	СД1 (n=37)	LADA (n=31)	СД2 (n=67)
1		2	3	4	5
Общее количество лимфоцитов	%	35,00 (22,00-48,00)	36,00 (31,50-40,00) p ₁ >0,05	29,00 (28,00-34,00) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	32,00 (25,00-36,00) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
	10 ⁹ /л	2,63 (2,43-2,84)	1,93 (1,60-2,28) p ₁ =0,025	1,55 (1,20-1,67) p ₁ =0,004 p ₂ =0,05	1,65 (1,32-2,22) p ₁ =0,001 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
CD3 ⁺ -лимфоциты	%	69,70 (65,94-70,90)	73,69 (70,86-76,18) p ₁ =0,04	75,81 (73,13-79,31) p ₁ =0,008 p ₂ >0,05	71,41 (65,97-75,13) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ =0,01
	10 ⁹ /л	1,32 (1,24-1,36)	1,39 (1,22-1,59) p ₁ >0,05	1,41 (1,12-1,52) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	1,33 (1,07-1,50) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
CD8 ⁺ -лимфоциты	%	24,28 (23,93-29,48)	25,35 (21,73-31,84) p ₁ >0,05	26,03 (21,69-29,41) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	22,60 (17,98-26,60) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ =0,04
	10 ⁹ /л	0,32 (0,30-0,37)	0,23 (0,19-0,30) p ₁ =0,009	0,22 (0,14-0,28) p ₁ =0,007 p ₂ >0,05	0,30 (0,25-0,41) p ₁ >0,05 p ₂ =0,04 p ₃ =0,02
CD4 ⁺ -лимфоциты	%	44,30 (34,16-45,81)	45,03 (41,38-50,26) p ₁ >0,05	45,87 (38,67-50,65) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	45,82 (40,07-50,07) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
	10 ⁹ /л	0,46 (0,44-0,57)	0,44 (0,39-0,66) p ₁ >0,05	0,46 (0,35-0,55) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	0,43 (0,34-0,54) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05

1		2	3	4	5
CD16 ⁺ CD56 ^{low} - лимфоциты	%	17,24 (16,18-19,88)	13,71 (10,37-17,07) p ₁ =0,03	11,60 (9,10-14,36) p ₁ =0,007 p ₂ >0,05	17,98 (13,46-22,25) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ =0,005
	10 ⁹ /л	0,84 (0,66-0,87)	0,87 (0,70-0,99) p ₁ >0,05	0,81 (0,63-0,93) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	0,84 (0,71-0,96) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
CD19 ⁺ -лимфоциты	%	10,78 (8,09-14,18)	12,06 (8,80-13,06) p ₁ >0,05	11,13 (6,87-13,86) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	9,39 (7,07-11,81) p ₁ >0,05 p ₂ =0,04 p ₃ >0,05
	10 ⁹ /л	0,20 (0,15-0,27)	0,23 (0,16-0,29) p ₁ >0,05	0,16 (0,11-0,23) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	0,18 (0,13-0,25) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05

Примечание: p₁ – достоверность отличий относительно аналогичного показателя у здоровых доноров; p₂ – относительно аналогичного показателя у пациентов с СД1; p₃ – относительно аналогичного показателя у пациентов с LADA; n – количество обследованных лиц

Относительное содержание Т-лимфоцитов у пациентов с СД1 (p=0,04) и LADA (p=0,008) превышало таковое у здоровых доноров. При этом относительное содержание Т-клеток у больных СД1 достоверно не отличалось (p>0,05) от соответствующих значений у пациентов с LADA и СД2. Процентное содержание CD3⁺-лимфоцитов у больных LADA оказалось достоверно выше такового в группе сравнения (пациенты с СД2) (p=0,01), достоверных же различий в абсолютном содержании Т-клеток у больных в сравниваемых клинических группах наблюдения выявлено не было (p>0,05) (табл. 7).

Абсолютное количество цитотоксических лимфоцитов в периферической крови у пациентов с СД1 и LADA оказалось достоверно

ниже такового как у здоровых добровольцев ($p=0,009$ и $p=0,007$, соответственно), так и у пациентов с СД2 ($p=0,04$ и $p=0,02$, соответственно). Величины этих показателя у больных СД1 и LADA практически не различались. Процентное содержание $CD8^+$ -лимфоцитов у пациентов с LADA превышало их уровень у больных СД2 ($p=0,04$) (табл. 7).

Оценка абсолютного и относительного содержания в крови $CD4^+$ -лимфоцитов у пациентов сравниваемых клинических групп статистически значимых отличий не выявила ($p>0,05$) (табл. 7).

Относительное содержание циркулирующего пула лимфоцитов-киллеров ($CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов) у пациентов с СД1 оказалось достоверно ниже такового в контроле ($p=0,03$). У пациентов с LADA количество циркулирующих лимфоцитов-киллеров было достоверно более сниженным по сравнению с содержанием их в крови у здоровых лиц ($p=0,007$) и более низким, чем в группе сравнения ($p=0,005$). Абсолютное содержание $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов у больных сравниваемых клинических групп наблюдения практически не различалось ($p>0,05$) (табл. 7).

Содержание (абсолютное и относительное) В-лимфоцитов у пациентов с СД1 и LADA не отличалось от соответствующих значений у здоровых доноров ($p>0,05$). В то же время обращало на себя внимание, что относительное количество $CD19^+$ -клеток у пациентов с СД1 превышало их число у пациентов с СД2 ($p=0,04$) (табл. 7).

Таким образом, характерным для сахарного диабета аутоиммунного генеза является уменьшение общего количества лимфоцитов и прежде всего снижение абсолютного количества цитотоксических лимфоцитов. Выявленные по итогам проведенного исследования особенности процентного распределения субпопуляций лимфоцитов у пациентов с СД1 и LADA указывают на повышенное содержание в крови Т-лимфоцитов и значимое снижение циркулирующего пула клеток врожденного иммунного ответа – NK-лимфоцитов.

3.1.2 Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

При оценке общего количества лимфоцитов в крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями не было выявлено достоверных различий в относительном содержании клеток по сравнению с таковым у здоровых доноров ($p>0,05$), а также достоверных различий величин этого показателя у пациентов сравниваемых клинических групп наблюдения ($p>0,05$) (табл. 8). Абсолютное количество лимфоцитов у пациентов всех клинических групп оказалось достоверно ниже контроля ($p=0,01$ – при гипотиреозе, $p=0,001$ – при эутиреозе и гипертиреозе). Достоверных отличий в абсолютном содержании лимфоцитов у больных сравниваемых групп наблюдения обнаружено не было (табл. 8).

Относительное количество Т-лимфоцитов у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза значительно превышало соответствующие значения у здоровых лиц и больных в фазе гипотиреоза ($p=0,001$). Содержание Т-клеток в крови у пациентов с гипотиреозом и здоровых доноров было сопоставимо ($p>0,05$). Абсолютное содержание CD3⁺-лимфоцитов у больных АИТ, по сравнению с уровнем их в контроле, а также в зависимости от функционального состояния щитовидной железы, практически не различалось ($p>0,05$).

Относительное содержание Т-лимфоцитов в крови у пациентов с БГ достоверно превышало количество CD3⁺-клеток у лиц контрольной группы ($p=0,01$ и $p=0,02$ при эутиреозе и гипертиреозе, соответственно). Достоверных различий в процентном количестве Т-клеток при БГ в зависимости от функционального состояния щитовидной железы выявлено не было ($p>0,05$). Абсолютное количество Т-лимфоцитов в фазу эутиреоза оказалось достоверно ниже такового как у здоровых лиц ($p=0,01$), так и у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза ($p=0,04$) (табл.8).

Содержание Т-клеток у пациентов с гипертиреозом значимо не отличалось от такового у здоровых доноров и пациентов с БГ в фазе эутиреоза ($p > 0,05$) (табл. 8).

Таблица 8

Содержание лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Показатель		Здоровые доноры (n=30)	АИТ (n=29)		БГ (n=45)	
			Гипотиреоз (n=10)	Эутиреоз (n=19)	Эутиреоз (n=14)	Гипертиреоз (n=31)
1	2	3	4	5	6	
Общее количество лимфоцитов	%	35,00 (22,00-48,00)	31,00 (24,00-33,00) $p_1 > 0,05$	28,50 (25,50-36,00) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	35,00 (34,00-38,00) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	34,00 (30,00-38,5) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
	10 ⁹ /л	2,63 (2,43-2,84)	2,19 (1,67-2,67) $p_1 = 0,01$	2,02 (1,71-2,81) $p_1 = 0,001$ $p_2 > 0,05$	1,64 (1,36-1,87) $p_1 = 0,001$ $p_3 > 0,05$	1,98 (1,61-2,19) $p_1 = 0,001$ $p_4 > 0,05$
CD3 ⁺ -лимфоциты	%	69,70 (65,94-70,90)	71,04 (70,33 – 71,74) $p_1 > 0,05$	75,22 (74,32-76,06) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,001$	75,00 (72,34-75,45) $p_1 = 0,01$ $p_3 > 0,05$	74,06 (69,30-79,18) $p_1 = 0,02$ $p_4 > 0,05$
	10 ⁹ /л	1,32 (1,24-1,36)	1,38 (1,07-1,69) $p_1 > 0,05$	1,87 (1,31-2,75) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	1,18 (1,07-1,24) $p_1 = 0,01$ $p_3 = 0,04$	1,45 (1,06-1,51) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
CD8 ⁺ -лимфоциты	%	24,28 (23,93-29,48)	23,96 (23,38 – 24,53) $p_1 > 0,05$	25,59 (22,97-27,70) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	28,45 (21,69-29,12) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	26,05 (24,10-28,82) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
	10 ⁹ /л	0,32 (0,30-0,37)	0,46 (0,33-0,61) $p_1 = 0,01$	0,59 (0,48-0,89) $p_1 = 0,006$ $p_2 > 0,05$	0,39 (0,38-0,43) $p_1 > 0,05$ $p_3 = 0,04$	0,43 (0,39-0,56) $p_1 = 0,01$ $p_4 > 0,05$

1		2	3	4	5	6
CD4 ⁺ -лимфоциты	%	44,30 (34,16- 45,81)	43,65 (41,28 – 46,03) p ₁ >0,05	45,73 (44,46- 50,94) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	41,16 (39,69- 41,88) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05	44,07 (40,51-51,96) p ₁ >0,05 p ₄ >0,05
	10 ⁹ /л	0,46 (0,44-0,57)	0,85 (0,56-1,20) p ₁ =0,006	1,10 (0,79-1,85) p ₁ =0,008 p ₂ >0,05	0,68 (0,59-0,79) p ₁ >0,05 p ₃ =0,045	0,85 (0,65-1,10) p ₁ =0,004 p ₄ >0,05
CD16 ⁺ CD56 ^{low} - лимфоциты	%	17,24 (16,18- 19,88)	18,69 (15,54 – 21,84) p ₁ >0,05	9,25 (7,31-12,65) p ₁ =0,002 p ₂ =0,002	12,43 (12,10- 17,37) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05	10,48 (5,80-12,41) p ₁ =0,001 p ₄ >0,05
	10 ⁹ /л	0,84 (0,66-0,87)	0,33 (0,24-0,43) p ₁ <0,001	0,24 (0,15-0,30) p ₁ <0,001 p ₂ >0,05	0,21 (0,16-0,25) p ₁ =0,006 p ₃ >0,05	0,19 (0,16-0,26) p ₁ <0,001 p ₄ >0,05
CD19 ⁺ -лимфоциты	%	10,78 (8,09– 14,18)	9,35 (6,45 – 12,25) p ₁ =0,03	14,03 (11,56- 15,36) p ₁ >0,05 p ₂ =0,006	11,51 (10,66- 13,98) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05	11,73 (9,05-17,65) p ₁ >0,05 p ₄ >0,05
	10 ⁹ /л	0,20 (0,15-0,27)	0,18 (0,12-0,22) p ₁ >0,05	0,32 (0,20-0,52) p ₁ >0,05 p ₂ =0,05	0,19 (0,17-0,20) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05	0,25 (0,15-0,39) p ₁ >0,05 p ₄ >0,05

Примечание: p₁ – достоверность отличий относительно аналогичного показателя у здоровых доноров; p₂ – относительно аналогичного показателя у пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p₃ – относительно аналогичного показателя у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p₄ – относительно аналогичного показателя у пациентов с БГ в фазе эутиреоза; n – количество обследованных лиц

Относительное количество цитотоксических лимфоцитов в крови у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы и у здоровых доноров статистически значимо не отличалось (p>0,05), не было выявлено существенных различий в величине этого показателя в зависимости от нозологического варианта тиреопатий и гормонального статуса (p>0,05)

(табл. 8). Абсолютное содержание $CD8^+$ -клеток у пациентов с АИТ превышало их количество у здоровых доноров ($p=0,01$ – при гипотиреозе и $p=0,006$ – при эутиреозе), а также содержание данных клеток в крови у пациентов с БГ в состоянии эутиреоза ($p=0,04$) (табл. 8).

Содержание цитотоксических лимфоцитов у пациентов с БГ в состоянии эутиреоза было сопоставимо с таковым у здоровых лиц ($p>0,05$). При БГ в фазе гипертиреоза абсолютное число $CD8^+$ -лимфоцитов превышало их контрольный уровень ($p=0,01$) (табл. 8).

Процентное содержание Th-лимфоцитов, как и относительное количество $CD8^+$ -клеток в зависимости от нозологического варианта тиреопатий и функционального состояния щитовидной железы ($p>0,05$) практически не изменялось и было сопоставимо с таковым у здоровых доноров ($p>0,05$) (табл. 8).

Абсолютное количество $CD4^+$ -лимфоцитов у больных АИТ как в фазе эутиреоза ($p=0,008$), так и при гипотиреозе ($p=0,006$) превышало их уровень у здоровых лиц. Существенных различий в содержании $CD4^+$ -клеток в зависимости от гормонального статуса пациентов при АИТ обнаружено не было ($p>0,05$). Количество Th-лимфоцитов при эутиреоидном состоянии АИТ превышало их содержание у пациентов с БГ в фазе эутиреоза ($p=0,045$) (табл. 8). Абсолютное число $CD4^+$ -лимфоцитов при БГ в фазе гипертиреоза было увеличено по сравнению с контрольной величиной ($p=0,004$). Количество Th-лимфоцитов у пациентов с БГ в состоянии эутиреоза не отличалось от их содержания у здоровых лиц ($p>0,05$) (табл. 8).

При оценке содержания циркулирующих NK-лимфоцитов у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза были выявлены более низкие показатели их абсолютного ($p<0,001$) и относительного ($p=0,002$) количества по сравнению с соответствующими значениями у здоровых добровольцев. У больных в фазе гипотиреоза было зарегистрировано снижение абсолютного числа $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов ($p<0,001$), по сравнению с их количеством у здоровых доноров, сопоставимое с уменьшением числа NK-клеток у

пациентов с АИТ в эутиреоидном состоянии. В то же время относительное количество лимфоцитов-киллеров при гипотиреозе достоверно превышало ($p=0,002$) содержание данной субпопуляции клеток у больных АИТ в фазе эутиреоза и соответствовало таковому у здоровых лиц (табл.8). Обращало на себя внимание также снижение абсолютного и относительного количества NK-лимфоцитов ($p<0,001$ и $p=0,001$, соответственно) при БГ у пациентов с тиреотоксикозом и уменьшение абсолютного содержания ($p=0,006$) данных клеток – в фазе эутиреоза. Статистически значимых различий в количестве $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов (как абсолютном, так и относительном) у пациентов с АИТ и БГ в состоянии эутиреоза выявлено не было (табл. 8).

Абсолютное количество В-лимфоцитов в крови у пациентов с АИТ, БГ и у здоровых доноров не различалось ($p>0,05$); статистически значимых отличий величины этого показателя в зависимости от нозологического варианта тиреопатий и гормонального статуса не обнаруживалось ($p>0,05$) (табл. 8). Анализ процентного содержания В-клеток выявил достоверное уменьшение количества $CD19^+$ -лимфоцитов при гипотиреозе по сравнению с таковым как у здоровых лиц ($p=0,03$), так и у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза ($p=0,006$). Относительное число В-лимфоцитов у больных с АИТ в состоянии эутиреоза соответствовало величине этого показателя у здоровых доноров и не отличалось от количества $CD19^+$ -клеток у пациентов с БГ с эутиреозом ($p>0,05$). В свою очередь, статистически значимых отличий в содержании В-лимфоцитов при БГ в зависимости от функционального состояния щитовидной железы выявлено не было ($p>0,05$). Количество В-лимфоцитов у пациентов с БГ (в фазе эу- и гипертиреоза) находились на уровне, сопоставимом с количеством их у здоровых лиц ($p>0,05$) (табл. 8).

Таким образом, результаты иммунофенотипирования лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями показали, что аутоиммунные тиреопатии, как и сахарный диабет аутоиммунного генеза, ассоциированы со снижением общего количества лимфоцитов и циркулирующих лимфоцитов-натуральных киллеров, а также с повышением

относительного содержания Т-клеток в крови (за исключением пациентов в состоянии гипотиреоза). Отличительными от аутоиммунного сахарного диабета изменениями в субпопуляционном составе клеток явилось повышение количества цитотоксических и Th-лимфоцитов в крови у больных аутоиммунными тиреопатиями (кроме пациентов с БГ в стадии эутиреоза). Поскольку лимфоциты являются непосредственными участниками воспаления, протекающего в органе-мишени, очевидно, что преобладание содержания одних типов клеток и дефицит других сопряжены с механизмами развития сахарного диабета и тиреопатий аутоиммунного генеза.

3.2 Концентрация аутоантител к поджелудочной и щитовидной железам в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями

3.2.1 Концентрация органоспецифических антител в сыворотке крови больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза

Концентрация аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD), к поверхностному антигену β -клетки (ICA), к инсулину (IAA) в сыворотке крови у больных аутоиммунным сахарным диабетом (СД1 и LADA) достоверно не различалась в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет) и не зависела от наличия микроангиопатий ($p > 0,05$) (табл. 9).

Сравнительный анализ концентрации органоспецифических антител в зависимости от клинического фенотипа аутоиммунного СД показал, что уровень антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD) и к поверхностному антигену β -клетки (ICA) у пациентов с LADA оказался достоверно выше ($p = 0,02$ и $p = 0,03$, соответственно) такового у пациентов с СД1. При оценке концентрации в сыворотке крови антител к инсулину (IAA) достоверных отличий показателя между группами больных СД1 и LADA выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 9).

Концентрация антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты, поверхностному антигену β -клетки и инсулину в сыворотке крови у пациентов с различными клиническими вариантами аутоиммунного сахарного диабета (Ме (Q₁-Q₃))

Показатель	СД1 (n=37)	LADA (n=31)
GAD, Ед/мл	0,48 (0,39-0,57)	0,85 (0,57-1,21) p=0,02
ICA, ед.ОП	0,20 (0,12-0,37)	0,44 (0,31-0,54) p=0,03
IAA, Ед/мл	7,17 (5,37-8,52)	6,30 (5,35-7,50) p>0,05

Примечание: p – достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с СД1; n – количество обследованных лиц

Таким образом, среди указанных клинических вариантов аутоиммунного сахарного диабета антителопродукция была более выражена при латентном аутоиммунном диабете взрослых.

3.2.2 Концентрация аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Концентрация антител к ТПО в крови у пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза и эутиреоза значимо не различалась (p>0,05). При БГ уровень данных антител у больных в фазе эутиреоза оказался достоверно ниже (p=0,02), чем у пациентов с тиреотоксикозом. В свою очередь, концентрация анти-ТПО у больных АИТ в фазе эутиреоза достоверно превышала (p=0,04) соответствующие значения у пациентов с БГ с аналогичным функциональным состоянием щитовидной железы (табл. 10).

Анализ содержания антител к рецептору тиреотропного гормона в крови у пациентов с АИТ выявил наличие незначительных концентраций данного анализа, не превышающих диагностически значимый порог и не изменяющихся в зависимости от гормонального статуса щитовидной железы ($p > 0,05$). При БГ концентрация анти-рТТГ при гипертиреозе оказалась значительно выше ($p = 0,006$), чем при эутиреоидном состоянии щитовидной железы. Сравнение данного показателя у пациентов с АИТ и БГ в фазе эутиреоза закономерно показало повышенные концентрации антител к рТТГ при БГ ($p = 0,007$) (табл. 10).

Таблица 10

Концентрация антител к тиреоидной пероксидазе и рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные больные		Анти-ТПО, МЕ/мл	Анти-рТТГ, Ед/л
АИТ (n=29)	С гипотиреозом (n=10)	479,90 (380,10-780,00)	0,50 (0,00-0,60)
	С эутиреозом (n=19)	764,00 (507,50-885,00) $p_1 > 0,05$	0,64 (0,00-1,00) $p_1 > 0,05$
БГ (n=45)	С эутиреозом (n=14)	9,00 (5,70-10,25) $p_2 = 0,04$	3,50 (2,65-26,65) $p_2 = 0,007$
	С гипертиреозом (n=31)	585,00 (159,60-800,00) $p_3 = 0,02$	34,70 (33,20-37,07) $p_3 = 0,006$

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

Таким образом, при оценке концентрации антител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы (анти-ТПО и анти-рТТГ) у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями установлено, что при АИТ

высокое содержание антител сохранялось независимо от уровня тиреоидных гормонов, в то время как у пациентов с БГ концентрация анти-ТПО и анти-rТТГ в крови заметно увеличивалась при тиреотоксикозе.

Подытоживая полученные результаты, следует заключить, что гуморальное звено иммунитета активно вовлечено в развитие всех рассматриваемых форм эндокринопатий аутоиммунного генеза.

3.3 Состояние системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями

3.3.1 Система IL-2, IL-4, TNF α и комплементарных им рецепторов лимфоцитов крови у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза

При сравнении показателей, характеризующих содержание цитокинов (IL-2, IL-4, TNF α) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество комплементарных им рецепторов в лимфоцитах крови, у пациентов в зависимости от стажа сахарного диабета (до 4-х лет, 4-10 лет) достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$). В связи с этим при описании состояния системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов у пациентов с СД представлены только данные, учитывающие клинические варианты заболевания (СД1, LADA, СД2) и наличие микроангиопатий.

3.3.1.1 Содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза

Исследование состояния системы IL-2 у пациентов с манифестным СД1 (без микроангиопатий) показало, что концентрация цитокина в культуральных средах была в 4 раза выше, чем концентрация IL-2 у здоровых доноров ($p = 0,04$) (табл. 11).

Следует отметить, что у больных СД2 (группа сравнения), не имевших нефропатии или ретинопатии, концентрация IL-2 в супернатантах клеточных культур в 6 раз превышала ($p = 0,001$) соответствующие значения у здоровых

добровольцев, а также достоверно ($p=0,001$) превосходила содержание цитокина в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у больных СД1 без микроангиопатий (табл. 11).

Таблица 11

Концентрация IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза с учетом наличия микроангиопатий (Me (Q_1 - Q_3))

Обследованные лица		IL-2, пг/мл	CD25 ⁺ -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,31 (7,78-21,99)	23,90 (21,60-37,80)
Больные СД1 (n=37)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	65,55 (34,74-80,48) $p_1=0,04$	25,60 (21,00-28,90) $p_1>0,05$
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	114,30 (66,26-145,25) $p_1=0,04$ $p_2=0,045$	35,95 (32,10-39,80) $p_1>0,05$ $p_2=0,045$
Больные LADA(n=31)	Без диабетических микроангиопатий (n=12)	119,36 (105,11-124,11) $p_1=0,001$ $p_2=0,001$	23,10 (19,40-25,65) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	228,87 (183,23-245,11) $p_1=0,017$ $p_3=0,003$ $p_4=0,03$	34,75 (25,40-41,00) $p_1>0,05$ $p_3=0,03$ $p_4>0,05$
Больные СД2 (n=67)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	100,36 (90,40-114,61) $p_1=0,001$ $p_2=0,001$ $p_3>0,05$	28,80 (22,25-33,70) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$
	С нефропатией или ретинопатией (n=49)	123,54 (117,06-145,57) $p_1=0,003$ $p_4>0,05$ $p_5=0,045$ $p_6>0,05$	29,90 (25,35-35,65) $p_1>0,05$ $p_4>0,05$ $p_5>0,05$ $p_6>0,05$

Примечание (здесь и в табл. 12 и 13): p_1 – достоверность различий значений относительно аналогичного показателя у здоровых доноров; p_2 – у пациентов с СД1 без осложнений; p_3 – у пациентов с LADA без осложнений; p_4 – у пациентов с СД1 с микроангиопатиями; p_5 – у пациентов с LADA с микроангиопатиями; p_6 – у пациентов с СД2 без осложнений; n – количество обследованных лиц

При сравнении количества лимфоцитов крови, несущих рецепторы к IL-2, у больных СД1 без осложнений и здоровых доноров достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$). Статистически значимых различий величины данного показателя у пациентов с СД1 без микроангиопатий и у больных СД2 без микроангиопатий также не обнаруживалось (табл. 11).

Результаты оценки состояния системы IL-2 у пациентов с LADA позволили установить, что у больных без микроангиопатий концентрация IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови в 7,5 раз превышала ее уровень у здоровых лиц ($p = 0,001$) (табл. 11).

Следует отметить также, что содержание цитокина в культуральных средах в 2 раза превышало его уровень у пациентов с СД1 без микроангиопатий ($p = 0,001$) и было сопоставимо с концентрацией IL-2 у пациентов группы сравнения (СД2 без микроангиопатий) ($p > 0,05$). Количество CD25⁺-лимфоцитов в крови у больных LADA, не имевших осложнений, не отличалось от аналогичных значений у здоровых доноров, а также у пациентов с СД1 без осложнений и у пациентов группы сравнения ($p > 0,05$) (табл. 11).

Оценка состояния системы IL-2 у больных сахарным диабетом с учетом наличия диабетических микроангиопатий показала, что при СД1, отягощенным нефропатией или ретинопатией, концентрация IL-2 в супернатантах клеточных культур и число лимфоцитов в крови, презентующих рецептор к IL-2, было достоверно повышено ($p = 0,045$ и $p = 0,045$, соответственно) по сравнению с соответствующими значениями у пациентов с СД1 без микроангиопатий (табл. 11).

Содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у больных СД1 с микроангиопатиями было сопоставимо с величиной данного параметра в группе сравнения (СД2 с осложнениями) ($p > 0,05$). Количество CD25-несущих лимфоцитов у больных СД1 с микроангиопатиями не отличалось от их содержания у больных СД2 с микроангиопатиями ($p > 0,05$) (табл. 11).

При наличии микроангиопатий у пациентов с LADA показатель концентрации IL-2 был увеличен в 2 раза ($p=0,003$), а количество лимфоцитов, несущих CD25, – в 1,5 раза ($p=0,03$), по сравнению с аналогичными параметрами у больных LADA, не имевших микроангиопатий (табл. 11). Содержание IL-2 в супернатантах клеточных культур у больных LADA с микроангиопатиями статистически значимо превышало его концентрацию у пациентов с СД1, имевших микроангиопатии ($p=0,03$), а также у пациентов группы сравнения (СД2 с микроангиопатиями) ($p=0,045$). Достоверных различий в количестве CD25-презентирующих лимфоцитов в сравниваемых группах наблюдения обнаружено не было ($p>0,05$) (табл. 11).

Таким образом, при исследовании *in vitro* концентрации IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза, было показано, что содержание цитокина значительно повышено как при СД1, так и при LADA. Наличие в клинической картине заболевания диабетических микроангиопатий было ассоциировано с повышенной концентрацией IL-2 и увеличением числа CD25⁺-лимфоцитов, превосходящими значения данных показателей у пациентов, не имевших микроангиопатий. При этом латентный аутоиммунный диабет взрослых характеризовался более высоким содержанием в культуральных средах IL-2, чем СД1 манифестного течения.

3.3.1.2 Содержание IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза

В супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у пациентов с СД1 без микроангиопатий, концентрация IL-4 была сопоставима с таковой у здоровых доноров ($p>0,05$). В то же время число лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-4, достоверно превышало их количество у здоровых лиц ($p=0,004$) (табл. 12).

Концентрация IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза с учетом наличия микроангиопатий (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		IL-4, пг/мл	CD124 ⁺ -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,09 (14,92-17,72)	4,40 (3,80-4,50)
Больные СД1 (n=37)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	15,79 (13,22-18,90) p ₁ >0,05	10,10 (7,80-11,90) p ₁ =0,004
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	17,93 (13,97-44,79) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	10,90 (10,70-11,10) p ₁ =0,004 p ₂ >0,05
Больные LADA(n=31)	Без диабетических микроангиопатий (n=12)	31,31 (14,00-32,36) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	7,40 (6,65-8,00) p ₁ =0,045 p ₂ >0,05
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	116,41 (98,34-131,23) p ₁ =0,03 p ₃ =0,007 p ₄ =0,045	12,45 (9,20-15,55) p ₁ =0,031 p ₃ =0,007 p ₄ >0,05
Больные СД2 (n=67)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	32,73 (17,93-37,72) p ₁ =0,03 p ₂ =0,045 p ₃ >0,05	10,80 (8,00-12,85) p ₁ =0,025 p ₂ >0,05 p ₃ =0,043
	С нефропатией или ретинопатией (n=49)	34,33 (14,92-64,37) p ₁ =0,05 p ₄ >0,05 p ₅ =0,037 p ₆ >0,05	6,30 (5,20-9,25) p ₁ =0,027 p ₄ =0,009 p ₅ =0,045 p ₆ =0,03

Содержание IL-4 в супернатантах клеточных культур и количество CD124⁺-лимфоцитов в крови у пациентов с СД2 без осложнений было повышено (p=0,03 и p=0,025, соответственно), по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров. При этом концентрация

IL-4 в супернатантах клеточных культур у пациентов с СД1 без нефропатии или ретинопатии оказалась достоверно ниже таковой у больных СД2 без микроангиопатий ($p=0,045$) (табл. 12).

Анализ состояния системы IL-4 при LADA позволил установить, что у пациентов с данным вариантом диабета, не имевших микроангиопатий, содержание цитокина в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов не отличалось от его концентрации в культуральных средах моноклеарных лейкоцитов крови у здоровых доноров, пациентов группы сравнения (СД2 без осложнений) и у больных СД1, не имевших микроангиопатий ($p>0,05$) (табл. 12).

Количество лимфоцитов, несущих рецепторы к IL-4, у пациентов с LADA без нефропатии или ретинопатии превышало их число в крови у здоровых лиц ($p=0,045$) (табл. 12).

Содержание CD124⁺-лимфоцитов в крови больных LADA, не имевших микроангиопатий, оказалось ниже величины данного показателя у пациентов группы сравнения ($p=0,043$). Достоверных различий в количестве CD124⁺-лимфоцитов у пациентов с LADA и СД1 (без микроангиопатий) выявлено не было ($p>0,05$) (табл. 12).

Концентрация IL-4 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови у пациентов с СД1, имевших микроангиопатии, не отличалась от таковой у больных СД1 без микроангиопатий и у пациентов группы сравнения (СД2 с микроангиопатиями) ($p>0,05$) (табл. 12).

Число лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4 у пациентов с СД1, имевших микроангиопатии, не отличалось от их количества у больных СД1 без осложнений ($p>0,05$) и достоверно превышало число данных клеток у больных СД2, имевших микроангиопатии ($p=0,009$) (табл. 12).

У больных LADA с микроангиопатиями концентрация IL-4 в 3,5 раза превышала его уровень у пациентов с LADA без микроангиопатий ($p=0,007$) и в 7 раз – у больных СД1 с нефропатией или ретинопатией ($p=0,045$). При

этом количество лимфоцитов, презентующих CD124, было выше по сравнению с величиной данного показателя у пациентов с LADA без микроангиопатий ($p=0,007$) и не отличалось от числа CD124⁺-клеток у больных СД1, имевших микроангиопатии ($p>0,05$) (табл. 12). Следует отметить также, что содержание цитокина в супернатантах клеточных культур и количество CD124⁺-лимфоцитов в крови у больных LADA, имевших осложнения, достоверно превышали соответствующие показатели у пациентов из группы сравнения (СД2 с микроангиопатиями) ($p=0,037$ и $p=0,045$, соответственно) (табл. 12).

Таким образом, у пациентов с СД1 (без диабетических микроангиопатий и при наличии нефропатии или ретинопатии) и у больных LADA (без микроангиопатий) определялся дисбаланс в системе IL-4, проявляющийся в увеличении количества лимфоцитов крови, презентующих рецептор к IL-4, при отсутствии изменений продукции IL-4 культурой мононуклеарных лейкоцитов крови. Наличие диабетических микроангиопатий у пациентов с LADA было ассоциировано со значительно повышенными концентрациями IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и увеличением числа CD124⁺-клеток в крови, превосходящими значения данных показателей у больных без микроангиопатий.

3.3.1.3 Содержание TNF α и растворимой формы рецептора к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF α , у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза

При оценке комплекса показателей, отражающих состояние системы TNF α у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза, учитывались концентрация TNF α в культуре мононуклеарных лейкоцитов, количество CD120⁺-лимфоцитов крови, а также содержание в культуральных средах растворимой формы рецептора к TNF α (sTNF-R1) (табл. 13).

Результаты исследования показали, что у больных СД1, не имевших микроангиопатий, концентрация TNF α в супернатантах клеточных культур и содержание в крови CD120⁺-лимфоцитов не отличались от соответствующих значений у здоровых лиц ($p>0,05$) (табл. 13).

Таблица 13

Концентрация TNF α и растворимого рецептора 1 типа к TNF α в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF α , у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза с учетом наличия микроангиопатий (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		TNF α , пг/мл	CD120 ⁺ -лимфоциты, %	sTNF-R1, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	7,30 (6,30-7,60)	2670,00 (1470,00 - 4160,00)
Больные СД1 (n=37)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	35,73 (22,15-48,98) $p_1>0,05$	10,60 (7,00-12,50) $p_1>0,05$	1281,40 (1250,10-1291,80) $p_1=0,001$
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	20,62 (19,98-75,63) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$	7,75 (3,40-12,10) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$	1260,60 (1239,70-1312,70) $p_1=0,001$ $p_2>0,05$
Больные LADA(n=31)	Без диабетических микроангиопатий (n=12)	23,72 (19,80-370,49) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$	8,85 (8,20-14,15) $p_1=0,035$ $p_2>0,05$	1354,30 (1312,70-1396,00) $p_1=0,001$ $p_2=0,025$
	С нефропатией или ретинопатией (n=19)	354,34 (250,12-375,33) $p_1=0,015$ $p_3=0,016$ $p_4=0,007$	19,80 (13,55-23,45) $p_1=0,008$ $p_3=0,03$ $p_4=0,013$	1333,50 (1323,10-1385,60) $p_1=0,001$ $p_3>0,05$ $p_4=0,035$
Больные СД2 (n=67)	Без диабетических микроангиопатий (n=18)	28,56 (21,89-129,87) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$	11,40 (7,25-14,20) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$	1354,30 (1323,10-1375,20) $p_1=0,001$ $p_2=0,004$ $p_3>0,05$
	С нефропатией или ретинопатией (n=49)	62,86 (22,30-231,07) $p_1>0,05$ $p_4>0,05$ $p_5=0,014$ $p_6>0,05$	12,10 (6,10-15,05) $p_1>0,05$ $p_4>0,05$ $p_5>0,05$ $p_6>0,05$	1364,70 (1333,50-1416,80) $p_1=0,001$ $p_4=0,036$ $p_5>0,05$ $p_6>0,05$

В то же время следует указать, что концентрация sTNF-R1 в культуральных средах у пациентов этой клинической группы оказалась достоверно ($p=0,001$) ниже таковой у здоровых доноров. Более низкие значения концентрации sTNF-R1 относительно соответствующих показателей у здоровых лиц оказались характерными и для пациентов с СД2 без микроангиопатий ($p=0,001$); у больных СД1, не имевших нефропатии или ретинопатии, содержание sTNF-R1 было достоверно ниже ($p=0,004$), чем в группе сравнения (табл. 13). В культуре мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с LADA, не имевших микроангиопатий, содержание TNF α не отличалось от таковой у здоровых доноров ($p>0,05$). Количество CD120⁺-лимфоцитов в крови у пациентов данной группы наблюдения превышало их содержание у здоровых лиц ($p=0,035$) (табл. 13).

Концентрация sTNF-R1 была ниже по сравнению с таковой у здоровых доноров ($p=0,001$) (табл. 13). Концентрация TNF α и sTNF-R1 в супернатантах клеточных культур, а также содержание в крови лимфоцитов, несущих мембрансвязанный рецептор к TNF α , у пациентов с LADA без микроангиопатий не различались с аналогичными параметрами у больных СД2 без микроангиопатий ($p>0,05$) (табл. 13).

Сравнение значений, характеризующих содержание TNF α в культуральной среде и количество лимфоцитов крови, презентующих рецептор к TNF α , у пациентов с СД1 и LADA без осложнений различий не выявило ($p>0,05$); величина концентрации sTNF-R1 была выше ($p=0,025$) у больных LADA (табл. 13).

Концентрация TNF α , sTNF-R1 и количество CD120⁺-клеток у пациентов с СД1, отягощенном нефропатией или ретинопатией, были сопоставимы с соответствующими значениями у больных СД1, не имевших осложнений ($p>0,05$). Обращало на себя внимание также более низкое ($p=0,036$) (по сравнению таковым в группе сравнения) содержание sTNF-R1 (табл. 13).

Концентрация TNF α в культуральных средах и количество CD120⁺-лимфоцитов в группе больных LADA с нефропатией или ретинопатией превышали аналогичные показатели у пациентов с LADA без осложнений ($p=0,016$ и $p=0,03$, соответственно); концентрация же sTNF-R1 в сравниваемых клинических группах наблюдения не различалась ($p>0,05$) (табл. 13).

Содержание TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с LADA, имевших микроангиопатии, было значимо выше его концентраций у больных СД1 ($p=0,007$) и СД2 ($p=0,014$) с микроангиопатиями. Число лимфоцитов, презентующих рецептор к TNF α , и концентрация растворимого рецептора к TNF α в культуральных средах у пациентов с LADA, имевших микроангиопатии, достоверно превышали величину соответствующих показателей у пациентов с СД1 с нефропатией или ретинопатией (табл. 13).

Таким образом, СД1 и LADA характеризовались снижением концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови растворимой формы рецептора к TNF α , который является важным компонентом в механизмах регуляции провоспалительного действия TNF α . Отличительной чертой LADA явилось значительное увеличение концентрации TNF α в супернатантах клеточных культур и количества лимфоцитов в крови, презентующих рецептор к TNF α , при наличии в клинической картине пациентов диабетических микроангиопатий (табл. 13).

Результаты иммуноферментного анализа концентрации IL-2, IL-4, TNF α , sTNF-R1 и иммунофенотипирования клеток крови, направленного на установление количества CD25-, CD124-, CD120-позитивных лимфоцитов, указывают на дисбаланс системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза. С другой стороны, проведенные исследования подчеркивают гетерогенность аутоиммунного сахарного диабета. Так, латентный аутоиммунный диабет взрослых при наличии в клинической картине микроангиопатий был

ассоциирован с повышенным содержанием цитокинов IL-2, IL-4, TNF α в супернатантах клеточных культур и лимфоцитов в крови, несущих комплементарные им рецепторы. В то же время у больных СД1, имевших микроангиопатию, значимое увеличение значений показателей было установлено только относительно содержания IL-2 и количества CD25⁺-лимфоцитов.

3.3.2 Система IL-2, IL-4, TNF α и комплементарных им рецепторов лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

3.3.2.1 Содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Анализ результатов исследования показал, что содержание IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза было сопоставимо с концентрацией IL-2 у здоровых доноров ($p > 0,05$). У пациентов с АИТ, находившихся в состоянии гипотиреоза, концентрация цитокина оказалась ниже таковой у здоровых лиц ($p = 0,046$) и у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза ($p = 0,04$). Количество лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-2, у пациентов с АИТ (в состоянии гипотиреоза и эутиреоза), практически не отличалось от контрольных значений ($p > 0,05$) (табл. 14).

При БГ концентрация IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у пациентов в фазе гипертиреоза, достоверно превышала таковую у здоровых доноров ($p = 0,02$) и у пациентов с БГ в состоянии эутиреоза ($p = 0,035$). Содержание цитокина в культуральных средах у пациентов с БГ в эутиреоидной фазе не отличалось от концентрации IL-2 у здоровых лиц и у больных АИТ с эутиреозом ($p > 0,05$) (табл. 14). Количество CD25⁺-лимфоцитов в крови у пациентов с БГ было снижено по сравнению с числом данных клеток у здоровых доноров ($p = 0,04$ и $p = 0,036$ при гипертиреозе и эутиреозе, соответственно); содержание лимфоцитов,

несущих рецепторы к IL-2, в крови у пациентов с БГ в фазе эутиреоза оказалось ниже их количества у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза (табл. 14).

Таблица 14

Концентрация IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		IL-2, пг/мл	CD25 ⁺ -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,31 (7,78-21,99)	23,90 (21,60-37,80)
Больные АИТ (n=29)	С гипотиреозом (n=10)	7,78 (2,09-13,47) p ₁ =0,046	21,35 (16,30-23,10) p ₁ >0,05
	С эутиреозом (n=19)	13,47 (10,62-24,84) p ₁ >0,05 p ₂ =0,04	20,20 (17,35-29,90) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05
Больные БГ (n=45)	С эутиреозом (n=14)	13,47 (7,78-30,52) p ₁ >0,05 p ₃ >0,05	16,80 (13,10-18,60) p ₁ =0,036 p ₃ =0,045
	С гипертиреозом (n=31)	21,99 (13,47-45,58) p ₁ =0,02 p ₄ =0,035	17,30 (13,10-22,70) p ₁ =0,04 p ₄ >0,05

Примечание (здесь и в табл. 15 и 16): p₁ – достоверность отличий значений относительно аналогичного показателя у здоровых доноров; p₂ – у пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p₃ – у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p₄ – у пациентов с БГ в фазе эутиреоза; n – количество обследованных лиц

Таким образом, концентрация IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов была уменьшенной у пациентов в состоянии гипотиреоза, в то время как состояние тиреотоксикоза у больных было ассоциировано с повышенным содержанием в культуральных средах IL-2. Характерным для БГ (но не для АИТ) оказалось низкое количество лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-2, независящее от тиреоидного статуса пациентов.

3.3.2.2 Содержание IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

У пациентов с АИТ и БГ содержание IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови достоверно не отличалось от концентрации его у здоровых лиц ($p > 0,05$) (табл. 15).

Таблица 15

Концентрация IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		IL-4, пг/мл	CD124 ⁺ -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,09 (14,92-17,72)	4,40 (3,80-4,50)
Больные АИТ (n=29)	С гипотиреозом (n=10)	16,09 (14,92-17,25) $p_1 > 0,05$	4,65 (3,70-10,80) $p_1 = 0,05$
	С эутиреозом (n=19)	16,55 (15,85-17,25) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	7,00 (3,65-34,60) $p_1 = 0,001$ $p_2 > 0,05$
Больные БГ (n=45)	С эутиреозом (n=14)	15,85 (15,39-16,32) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	7,40 (4,20-13,40) $p_1 = 0,008$ $p_3 > 0,05$
	С гипертиреозом (n=31)	16,32 (15,85-19,12) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	6,55 (3,60-35,45) $p_1 = 0,005$ $p_4 > 0,05$

Количество CD124⁺-лимфоцитов в крови у больных АИТ в фазе эутиреоза оказалось увеличено, по сравнению с их содержанием у здоровых доноров ($p = 0,001$). У пациентов с БГ количество лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4, превышало их число у здоровых

добровольцев ($p=0,005$ и $p=0,008$ при гипертиреозе и эутиреозе, соответственно). Количество $CD124^+$ -лимфоцитов у пациентов с АИТ и БГ в фазе эутиреоза достоверно не различалось ($p>0,05$) (табл. 15).

Таким образом, при аутоиммунных тиреопатиях (подобно сахарному диабету аутоиммунного генеза) установлено увеличение количества лимфоцитов, презентирующих рецептор к IL-4, при отсутствии изменений концентрации IL-4 в супернатантах клеточных культур.

3.3.2.3 Содержание TNF α и растворимой формы рецептора к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентирующих рецепторы к TNF α , у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Оценка состояния системы фактора некроза опухолей альфа у больных аутоиммунными тиреопатиями позволила установить, что концентрация TNF α и растворимого TNF-рецептора в культуральных средах, а также количество $CD120^+$ -лимфоцитов в крови у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза были снижены по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров ($p=0,013$, $p=0,001$ и $p<0,001$, соответственно) (табл. 16).

У больных АИТ с гипотиреозом концентрация TNF α в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов не отличалась от содержания его у здоровых лиц ($p>0,05$). Процент лимфоцитов в крови, презентирующих рецептор к TNF α , и концентрация sTNF-R1 в культуральных средах оказались достоверно ниже ($p<0,001$ и $p=0,02$, соответственно) соответствующих значений у здоровых лиц (табл. 16). Концентрация растворимого рецептора к TNF α в культуральных средах у пациентов с АИТ в гипотиреоидном состоянии превышала содержание sTNF-R1 у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза ($p=0,043$) (табл. 16).

При БГ (как в фазу эутиреоза, так при гипертиреозе) концентрация TNF α была снижена ($p<0,001$ – в обоих случаях) по сравнению с таковой у здоровых доноров. Кроме того, у пациентов с БГ количество $CD120^+$ -лимфоцитов в крови ($p=0,002$ при эутиреозе и $p=0,003$ при гипертиреозе) и

содержание в супернатантах клеточных культур sTNF-R1 ($p=0,001$ – в обоих случаях) оказались ниже соответствующих контрольных значений (табл. 16).

Таблица 16

Концентрация TNF α и растворимого рецептора 1 типа к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови, количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы 1 типа к TNF α , у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		TNF α , пг/мл	CD120 ⁺ - лимфоциты, %	sTNF-R1, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	7,30 (6,30-7,60)	2670,00 (1470,00 - 4160,00)
Больные АИТ (n=29)	С гипотиреозом (n=10)	19,12 (15,91-212,72) $p_1 > 0,05$	1,00 (0,60-2,70) $p_1 < 0,001$	1446,80 (845,50- 1790,40) $p_1 = 0,02$
	С эутиреозом (n=19)	18,05 (12,73-106,43) $p_1 = 0,013$ $p_2 > 0,05$	3,00 (1,00-4,50) $p_1 = 0,004$ $p_2 > 0,05$	845,50 (587,80- 1275,00) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,043$
Больные БГ (n=45)	С эутиреозом (n=14)	13,05 (10,90-16,04) $p_1 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	2,75 (0,95-6,15) $p_1 = 0,002$ $p_3 > 0,05$	1027,67 (587,80- 1532,70) $p_1 = 0,001$ $p_3 > 0,05$
	С гипертиреозом (n=31)	16,51 (12,21-28,44) $p_1 < 0,001$ $p_4 > 0,05$	1,30 (0,70-4,10) $p_1 = 0,003$ $p_4 > 0,05$	1446,80 (637,70- 2219,90) $p_1 = 0,001$ $p_4 > 0,05$

У пациентов с АИТ и БГ, находившихся в состоянии эутиреоза, концентрация TNF α и растворимого рецептора к TNF α , а также количество

лимфоцитов, презентующих молекулу CD120, значимо не различались ($p > 0,05$ – во всех случаях) (табл. 16).

Для оценки функциональных резервов клеток к продукции TNF α было проведено исследование концентрации цитокина в супернатантах ФГА-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов крови (табл. 17).

Таблица 17

Особенности продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		Содержание TNF α в интактной культуре клеток, пг/мл	Содержание TNF α в ФГА-стимулированной культуре клеток, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	134,10 (88,22-217,06) $p_1=0,03$
Больные АИТ (n=29)	С гипотиреозом (n=10)	19,12 (15,91-212,72)	23,05 (17,21-40,06) $p_2=0,005$ $p_3 > 0,05$
	С эутиреозом (n=19)	18,05 (12,73-106,43)	16,36 (15,65-52,34) $p_2=0,03$ $p_3 > 0,05$
Больные БГ (n=45)	С эутиреозом (n=14)	13,05 (10,90-16,04)	11,95 (10,47-16,07) $p_2=0,002$ $p_3 > 0,05$
	С гипертиреозом (n=31)	16,51 (12,21-28,44)	12,24 (9,87-20,43) $p_2=0,007$ $p_3 > 0,05$

Примечание: p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре клеток у здоровых доноров; p_2 – в ФГА-стимулированной культуре клеток у здоровых доноров; p_3 – в интактной культуре клеток у лиц данной клинической группы; n – количество обследованных лиц

У здоровых доноров концентрация TNF α в супернатантах ФГА-стимулированных культур клеток значимо ($p=0,03$) превышала содержание цитокина в интактных культурах клеток. Концентрация TNF α в ФГА-стимулированных образцах культуральных сред у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями была достоверно снижена, по сравнению с концентрацией TNF α в митоген-стимулированных культурах мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых лиц (табл. 17).

Так, содержание TNF α в супернатантах ФГА-стимулированных клеточных культур у больных АИТ с гипотиреозом оказалось в 6 раз ($p=0,005$), а у больных АИТ в фазе эутиреоза – в 8 раз ($p=0,03$) ниже такового в контроле (табл. 17). У пациентов с БГ концентрация TNF α в стимулированных культурах мононуклеарных лейкоцитов была значимо ниже, по сравнению с содержанием цитокина в ФГА-стимулированных клеточных культурах у здоровых лиц ($p=0,002$ в фазе эутиреоза и $p=0,007$ – в состоянии гипертиреоза). При этом у лиц одной клинической группы достоверных различий концентрации TNF α в ФГА-стимулированных и интактных культурах клеток установлено не было ($p>0,05$ – во всех случаях) (табл. 17).

Данные факты свидетельствуют об угнетении базальной и стимулированной продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови в условиях *in vitro*, снижении содержания sTNF-R1, а также уменьшении количества лимфоцитов, презентующих мембраносвязанный рецептор к TNF α как при АИТ, так и при БГ.

Комплексная оценка состояния системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α у пациентов с тиреопатиями аутоиммунного генеза свидетельствует об изменениях продукции лимфоцитами цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и количества лимфоцитов в крови, презентующих мембрансвязанные рецепторы к данным цитокинам.

Обобщая сказанное, можно утверждать, что у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями нарушен баланс цитокиновой сети.

Наибольшие изменения содержания IL-2, IL-4 и TNF α в культурах 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 гипертиреоидном состояниях у больных аутоиммунными тиреопатиями.

3.4 Комплексное сравнение иммунологических параметров у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями

Для выявления комплекса наиболее информативных показателей, вовлеченных в патогенез аутоиммунного повреждения щитовидной и поджелудочной желез, нами был проведен дискриминантный анализ данных: оценивались субпопуляционный состав лимфоцитов крови у обследованных пациентов, концентрация цитокинов IL-2, TNF α , IL-4 в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов, несущих рецепторы к указанным цитокинам. Показатели содержания в сыворотке крови специфических аутоантител при проведении дискриминантного анализа намеренно не учитывались, поскольку эти данные использовались при клиническом обследовании для постановки диагноза и последующей классификации больных по нозологическим группам.

При построении модели использовался алгоритм последовательного добавления переменных. Были поставлены две классификационные (дискриминантные) задачи – построение канонической дискриминантной функции для выявления наиболее информативных признаков аутоиммунного сахарного диабета (задача 1) и аутоиммунных тиреопатий (задача 2), отличающих их от здоровых доноров.

В случае определения в качестве группирующего признака аутоиммунный сахарный диабет при пошаговом добавлении новых переменных, в соответствии с заданными критериями включения (F-

критерий >3,84) и исключения (F-критерий <2,71), учитывая также значения толерантности, λ Уилкса и уровня значимости (p), в модель были включены показатели концентрации IL-2, TNF α и процент CD4⁺-лимфоцитов (табл. 18).

Таблица 18

Пошаговое включение переменных в дискриминантное уравнение
(группирующий признак – сахарный диабет)

Шаг		Толерантность	F-критерий	Лямбда Уилкса	p
1	IL-2	1,000	77,389		0,001
2	IL-2	0,892	89,167	0,995	0,001
	TNF α	0,892	6,834	0,505	
3	IL-2	0,883	86,543	0,917	0,001
	TNF α	0,887	7,165	0,472	
	CD4 ⁺ -лимфоциты	0,988	5,874	0,464	

Оценка итоговой модели на способность различать группы здоровых лиц и больных СД показала, что величина χ^2 составляет 65,131; при этом уровень статистической значимости (p) был менее 0,001, что указывает на состоятельность данной модели.

Для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции с учетом влияния остальных переменных, входящих в модель, были рассчитаны нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции (табл. 19).

Таблица 19

Нормированные коэффициенты канонической
дискриминантной функции
(группирующий признак – сахарный диабет)

Показатель	Коэффициент
IL-2	1,027
TNF α	-0,411
CD4 ⁺ -лимфоциты	0,355

Учитывая абсолютные значения коэффициентов, обосновано, что наибольший вклад в значение дискриминантной функции, разделяющей группы здоровых лиц и больных СД, вносит показатель продукции мононуклеарными лейкоцитами крови IL-2. Коэффициенты, соответствующие концентрации в культуральной среде TNF α и количеству Th-лимфоцитов в крови, оказались близки друг к другу по абсолютному значению (табл. 19).

Таким образом, было получено каноническое дискриминантное уравнение:

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

При расчете центроидов (значений функции, получаемых при подстановке в дискриминантное уравнение средних значений показателей в группе) получены следующие значения: - 1,066 – для пациентов с СД и 1,206 – для здоровых лиц.

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 %.

Аналогично расчетам с пошаговым включением переменных, проведенным для решения задачи 1, при использовании в качестве группирующего признака аутоиммунные тиреопатии в дискриминантное уравнение были включены значения таких переменных, как количество NK-лимфоцитов, T-лимфоцитов, CD4⁺-, CD8⁺- и B-клеток, а также концентрации в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови IL-2, IL-4 и TNF α .

Оценка итоговой модели на способность разделять здоровых лиц и пациентов с аутоиммунными тиреопатиями показала, что значение χ^2 составляет 17,877; при этом уровень статистической значимости (p) был равен 0,022, что указывает на состоятельность данной модели.

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции для каждой переменной представлены в таблице 20.

Полученные результаты показывают, что максимальный вклад в значение дискриминантной функции вносят параметры содержания в крови НК-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов TNF α . Близкими по абсолютному значению нормированных коэффициентов оказались концентрации IL-2, IL-4 и количество В-лимфоцитов (-0,322, -0,270 и -0,239, соответственно). Минимальным вкладом в значение дискриминантного уравнения оказалась численность в крови CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов (табл. 20).

Таблица 20

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции (группирующий признак – тиреопатии)

Показатель	Коэффициент
CD16 ⁺ CD56 ^{low} -лимфоциты	1,193
CD3 ⁺ -лимфоциты	0,547
TNF α	0,509
IL-2	-0,322
IL-4	-0,270
CD19 ⁺ -лимфоциты	-0,239
CD8 ⁺ -лимфоциты	0,148
CD4 ⁺ -лимфоциты	-0,029

Таким образом, каноническое дискриминантное уравнение, полученное при решении классификационной задачи 2, имело вид:

$$d = -8,687 + 0,211 * \text{НК-лимфоциты} + 0,08 * \text{CD3}^+ + 0,004 * \text{TNF}\alpha - 0,006 * \text{IL-2} - 0,0,12 * \text{IL-4} - 0,061 * \text{CD19}^+ + 0,024 * \text{CD8}^+ - 0,004 * \text{CD4}^+.$$

В полученной модели заболевания значения центроидов для группы больных с тиреопатиями составило -0,618, для группы здоровых лиц – 0,425.

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, установлено, что изменения продукции IL-2, TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови и количество циркулирующих CD4⁺-лимфоцитов составляют комплекс иммунологических показателей, которые ассоциированы с развитием аутоиммунного воспаления как в поджелудочной, так и в щитовидной железе. В то же время показано, что роль изменения продукции IL-2 и содержания Th-лимфоцитов в развитие аутоиммунного сахарного диабета более значителен, чем при аутоиммунных тиреопатиях, при которых значимы изменения таких параметров клеточного иммунитета, как содержание циркулирующих клеток натуральных киллеров и общее количество Т-лимфоцитов. В целом анализ данных, включенных в выборку, указывает на наличие при аутоиммунных тиреопатиях более широкого набора ключевых показателей (число степеней свободы в модели заболевания – 8), вовлеченных в патогенез заболевания, чем при сахарном диабете (число степеней свободы в модели заболевания – 3). Независимо от этого, изменения продукции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови (IL-2 и TNF α при аутоиммунном СД, а также IL-2, IL-4 и TNF α при аутоиммунных тиреопатиях) находились в числе наиболее информативных факторов, связанных с аутоиммунным повреждением поджелудочной и щитовидной железы.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные представления о формировании и развитии аутоиммунного поражения поджелудочной и щитовидной желез сводятся к дисбалансу между механизмами поддержания толерантности к собственным антигенным структурам и аутореактивными иммунными процессами [Atkinson M., 2005; Cools N. et al., 2007; Репина Е.А., 2010; Buckner J.H., 2010]. Опираясь на эти данные, в настоящем диссертационном исследовании была рассмотрена система цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в качестве медиаторов, влияющих на выраженность аутоиммунного воспаления, гормонально-метаболические изменения и, как следствие, особенности клинического течения аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий.

4.1 Роль системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в механизмах развития аутоиммунного сахарного диабета

Аутоиммунный сахарный диабет развивается в условиях нарушения регуляторных свойств лимфоцитов, направленных на поддержание периферической толерантности, и активации эффекторных реакций лимфоцитов по отношению к продуцирующим инсулин β -клеткам поджелудочной железы [Репина Е.А., 2010; Akesson C. et al., 2010; Buckner J.H., 2010].

В проведенном нами исследовании отмечено снижение количества лимфоцитов в крови у пациентов с СД по сравнению со здоровыми лицами (табл. 7). Прогрессивное снижение числа лимфоцитов с последующим развитием лимфоцитопении при различных вариантах СД отмечено и в работах других авторов [Kanel R. et al., 2001; Fuller J.M. et al., 2009]. Ранее данный феномен связывали исключительно с влиянием гипергликемии и метаболическими эффектами терапевтического вмешательства [Kanel R. et al., 2001]. В последние годы в ряде исследований показано, что развитие аутоиммунного СД и формирование при этом лимфоцитопении

ассоциировано с мутациями в гене, кодирующем белок GIMAP5 (GTPase of the immune-associated protein 5) [Schulteis R.D. et al., 2008; Fuller J.M. et al., 2009; Wong V. et al., 2010; Bahr J. et al., 2011]. Данный протеин локализуется преимущественно в митохондриях и лизосомах лимфоцитов и способен подавлять реализацию митохондриального пути апоптоза [Dalberg U. et al., 2007; Schulteis R.D. et al., 2008], снижать активность лизосомальных ферментов, предотвращая тем самым пермеабиллизацию мембран [Kirkegaard T., Jaattela M., 2009; Wong V. et al., 2010]. Таким образом, функции GIMAP5 направлены на созревание и выживание на периферии Т-, В-лимфоцитов и НК-клеток. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что при аутоиммунном СД мутации сдвига рамки считывания гена *GIMAP5* ведут к спонтанной гибели путем апоптоза преимущественно CD8⁺-лимфоцитов, T-regs-лимфоцитов, НК-клеток и селективному выживанию аутореактивных Т-лимфоцитов [Poussier P. et al., 2005; Schulteis R.D. et al., 2008; Wong V. et al., 2010]. Следует отметить, что в нашей работе зафиксировано повышение относительного количества Т-лимфоцитов при аутоиммунных вариантах сахарного диабета (табл. 7), возможно, связанное с увеличением пула аутореактивных и эффекторных лимфоцитов.

Результаты наших исследований не позволяют говорить о развившейся у пациентов с СД1 и LADA лимфоцитопении, поскольку абсолютное содержание лимфоцитов в крови у обследованных лиц превышало 1,0 Г/л. Однако зарегистрированный нами факт снижения количества этих клеток у больных СД относительно здоровых доноров, в частности, за счет уменьшения популяции CD8⁺-лимфоцитов и CD16⁺CD56^{low}-клеток (табл. 7), является, вероятно, отражением описанных выше механизмов и с течением времени может привести к развитию лимфоцитопении. Помимо этого, нельзя исключить, что определенный вклад в уменьшение содержания циркулирующих в крови субпопуляций цитотоксических лимфоцитов и клеток натуральных киллеров может быть связано с миграцией их в поджелудочную железу с формированием воспалительного инфильтрата.

Подтверждением данной гипотезы явились результаты исследований, проведенные на модели аутоиммунного СД у экспериментальных животных, выявившие участие CD8⁺- и NK-клеток в развитии инсулита [Lieberman S.M. et al., 2003; Dogan Y. et al., 2006]. Доказательством того, что уменьшение в циркуляции количества цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток, а также повышение содержания Т-лимфоцитов первоначально связаны с аутоиммунным компонентом развития СД1 и LADA, а не метаболическими изменениями в организме, вызванными гипергликемией или терапевтическим воздействием, является установленное в нашем исследовании отсутствие подобных сдвигов в иммунной системе при СД2 (табл. 7).

В результате развития Т-клеточной аутоагрессии, направленной прежде всего на β-клетки поджелудочной железы, иммунокомпетентные клетки продуцируют цитокины, необходимые для обеспечения межклеточной коммуникации, а также способные непосредственно воздействовать на клетки, продуцирующие инсулин. По результатам нашего исследования, концентрации цитокинов IL-2, IL-4 и TNFα, а также количество лимфоцитов, презентующих рецепторы к ним, при СД1 и LADA были различны (табл. 11-13).

Сахарный диабет типа 1 на стадии отсутствия микроангиопатий характеризовался повышенным содержанием IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов (табл. 11). Известно, что основными клетками-продуцентами IL-2 являются Т-лимфоциты, а одна из функций данного цитокина состоит в активации пролиферации и дифференцировки Т-клеток [Лебедев Л.Р. и соавт., 2007]. Особый вклад IL-2 вносит в развитие в тимусе и поддержании функциональной активности на периферии Т-reg-лимфоцитов [Bayer A.L. et al., 2007; Buckner J.H., 2010; Grinberg-Bleyer Y. et al., 2010]. Во многом влияние IL-2 на клетки-мишени носит дозозависимый характер. Исследования Y. Grinberg-Bleyer (2010) указывают на то, что физиологические концентрации IL-2 участвуют в контроле гомеостаза

регуляторных Т-лимфоцитов, в то время как повышение концентрации данного цитокина в очаге воспаления в большей степени потенцирует функции эффекторных и аутореактивных Т-клеток. Эти данные в совокупности со сведениями о количественном дефиците Т-reg, их функциональных дефектах [Lindley S. et al., 2005; Lawson J.M. et al., 2008] при СД, а также результатами настоящего исследования (повышение концентрации цитокина в культуральных средах и количества Т-лимфоцитов в крови) указывают на то, что, возможно, основная роль IL-2 при СД1 заключается в поддержании воспалительной реакции в островках Лангерганса поджелудочной железы. Обнаруженное нами увеличение числа лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4, без повышения продукции самого IL-4 (табл. 12), вероятно, является отражением дисбаланса механизмов антагонизма, в норме существующих между Th1- и Th2-лимфоцитами. Это может способствовать хронической стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов IL-2 и поддержанию аутореактивных процессов в поджелудочной железе.

Исследование состояния системы TNF α при СД1 выявило снижение концентрации sTNF-R1 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов (табл. 13). Установлено, что sTNF-R1 является важным регулятором активности TNF α . С одной стороны, известна его способность препятствовать взаимодействию TNF α с мембранными рецепторами, что ограничивает цитотоксическое влияние цитокина на клетки [Wajant H. et al., 2003]. С другой стороны, снижение концентрации sTNF-R1 может приводить к усилению активности и пролонгированию действия цитокина [Locksley R.M. et al., 2001]. Основываясь на полученных в ходе настоящего исследования данных, 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 (табл. 13). Поскольку TNF α обладает способностью прямого цитотоксического воздействия на β -клетки

поджелудочной железы и стимуляции пролиферации аутореактивных клонов лимфоцитов [Uno S. et al., 2007], можно предположить, что в совокупности с действием IL-2 дисбаланс системы TNF α вносит весомый вклад в скорость деструкции инсулинпродуцирующей паренхимы.

Каскад гормонально-метаболических изменений (в первую очередь – гипергликемия), связанный с гибелью β -клеток островков Лангерганса, приводит в конечном счете к развитию тканевой гипоксии и появлению в клинической картине ангиопатий [Малышева Н.А., Потемина Т.Е., 2009; Заводник И.Б. и соавт., 2011].

Оценивая состояние системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α у пациентов с СД1 на фоне развившихся ангиопатий, нами было отмечено повышение продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами и увеличение числа лимфоцитов крови, несущих рецептор к данному цитокину, по сравнению с соответствующими показателями у больных СД1, без микроангиопатий (табл. 11). При этом сохранялось повышенным число CD124⁺-лимфоцитов крови (табл. 12) и сниженным содержание растворимой формы рецептора первого типа к TNF α (табл. 11). Отмеченная активация системы IL-2 может быть следствием окисления глюкозы в условиях хронической гипергликемии, генерации свободных радикалов и развития окислительного стресса [Војунга J. et al., 2004; Занозина О.В. и соавт., 2010; Заводник И.Б. и соавт., 2011].

Общепризнанно, что хроническая гипергликемия сопровождается образованием свободных радикалов и одновременным истощением антиоксидантных систем [Yadav U.C. et al., 2010]. При этом активируются MAP-киназы и ядерные факторы транскрипции NF-kB и AP1, регулирующие экспрессию генов провоспалительных цитокинов и их рецепторов (в том числе IL-2) [Evans J.L. et al., 2003; Заводник И.Б. и соавт., 2011]. Подобная наработка цитокинов является одним из механизмов развития эндотелиальной дисфункции при СД. В свою очередь, у больных СД1 с микроангиопатиями показатели продукции IL-4, TNF α и количества

лимфоцитов, несущих к ним рецепторы, (табл. 12, 13) оставались на уровне значений аналогичных параметров при неосложненном течении СД1.

По результатам проведенных нами исследований, при LADA установлены следующие изменения со стороны системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов. При отсутствии осложнений в виде нефро- или ретинопатии у пациентов с LADA определялась повышенная продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови (табл. 11). В данном случае концентрация цитокина в супернатантах клеточных культур превышала содержание IL-2 у пациентов с СД1, не имевших осложнений. Очевидно, что влияние IL-2 на Т-лимфоциты, описанное выше, реализуется и в патогенезе LADA. В то же время этот цитокин обладает способностью стимулировать синтез иммуноглобулинов плазматическими клетками [Сенников С.В. и соавт., 2004]. В нашей работе показано, что величина уровня антител к β -клеткам островков Лангерганса и к декарбоксилазе глутаминовой кислоты у пациентов с LADA превышала соответствующие значения у больных СД1 (табл. 9). Полученные данные согласуются с исследованиями, указывающими на преобладание титров GAD-антител при LADA [Andersen M.K. et al., 2010; Maruyama T. et al., 2011]. Повышенные концентрации аутоантител, относительно таковой у пациентов с СД1, указывают на большую вовлеченность гуморального иммунитета в патогенез LADA [Zhang Y. et al., 2010], что, в определенной степени, объясняет более медленную потерю инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы при LADA, по сравнению с СД1. Кроме того, существуют данные, что, наряду с GAD-антителами, повышенный титр антител к ICA ассоциирован с отсутствием тяжелых осложнений в виде макроангиопатий [Один В.И., Цыган В.Н., 2009]. С другой стороны, активная наработка аутоантител способна приводить к запуску механизмов комплементзависимой антителопосредованной цитотоксичности. Гибель β -клеток ведет к дополнительному освобождению антигенов и представлению их иммунокомпетентным клеткам. В результате иммунный ответ (как гуморальный, так и клеточный) распространяется на

новые эпитопы и антигены [Один В.И., Цыган В.Н., 2009; Репина Е.А., 2010], что в последующем приводит к развитию выраженной недостаточности продукции инсулина. Косвенным свидетельством вовлеченности Th2-лимфоцитов в данный процесс является выявленное нами увеличение числа CD124⁺-клеток (табл. 12). Но, как и у пациентов с СД1, нами не было отмечено повышение продукции IL4 относительно его концентрации у здоровых лиц (табл. 12).

При изучении состояния системы TNF α у пациентов с LADA, не имевших микроангиопатий, нами были выявлены изменения, аналогичные таковым у больных СД1 (в частности, отмечалось снижение концентрации sTNF-R1) (табл. 13). Однако концентрация данного компонента системы TNF α у больных LADA превышала таковую у пациентов с СД1, что можно рассматривать как более благоприятный фактор для выживания β -клеток. Эти данные отражают различия в механизмах развития аутоиммунного диабета первого типа и латентного аутоиммунного диабета взрослых и, по-видимому, указывают на вклад дисбаланса в системе TNF α в скорость развития аутоиммунного поражения островковых клеток. В свою очередь представляется вероятным, что нарушения в системе TNF α при аутоиммунных вариантах СД являются первичными, генетически детерминированными, и в меньшей степени связанными с дисгликемией и дислипидемией, поскольку оказываются максимально выраженными у больных СД1, а не у пациентов с СД2, при котором метаболические нарушения выражены сильнее [Занозина О.В. и соавт., 2010; Pham M.N. et al., 2011].

Как уже было отмечено в клинической характеристике больных сахарным диабетом, у пациентов с LADA после 4-х лет течения заболевания отмечалось выраженное падение продукции инсулина β -клетками и, соответственно, концентрации С-пептида в крови (рис. 2, 3). По всей вероятности, параллельно с усилением процессов глюкозо- и липотоксичности, связанных с угнетением продукции инсулина, недостаток

C-пептида также вносит вклад в развитие ангиопатий (табл. 5). Ряд исследований в последние годы указывает на ангиопротективные свойства C-пептида [Galuska D. et al., 2011; Maciejwska-Jeske M. et al., 2011; Vasic D. et al., 2012], проявляющиеся в защите эндотелиальных клеток от апоптоза, индуцированного окислительным стрессом, и стимуляции их пролиферации [Li Z. et al., 2003; Galuska D. et al., 2011].

При LADA, отягощенном микроангиопатиями, цитокиновый статус заметно отличался и от показателей у пациентов с неосложненным течением LADA, и от показателей у больных СД1 с микроангиопатиями. Так, при обследовании пациентов данной группы было выявлено повышение продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4 и TNF α , а также увеличение количества лимфоцитов, несущих рецепторы к изучаемым цитокинам (табл. 11-13). Это указывает на активацию воспалительного ответа с вовлечением ключевых цитокинов Th1- и Th2-пути на этапе наличия сосудистых осложнений, а также реализацию иммунных реакций с участием системы TNF α (в частности, за счет цитотоксического действия на инсулинпродуцирующие клетки, индукции апоптоза иммунокомпетентных клеток, стимуляции адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам) [Bruun C. et al., 2005, 2009; Arita R. et al., 2013].

Опираясь на современные представления о преобладании T-клеточной агрессии по отношению к β -клеткам при СД1 [Dogan Y. et al., 2006; Pugliese A., 2010; Culina S., Mallone R., 2011] и данные о том, что для поддержания активации T-лимфоцитов требуется постоянное взаимодействие между T-клеточным рецептором и антиген-представляющим пептидом HLA [Репина Е.А., 2010], можно предположить, что после гибели значительной части инсулинпродуцирующей паренхимы антигенная нагрузка снижается и воспалительный процесс угнетается. Последующая активация продукции провоспалительных цитокинов связан с механизмами глюкозо- и липотоксичности, системным окислительным стрессом [Evans J.L. et al., 2003; Wojunga J. et al., 2004; Заводник И.Б. и соавт., 2011], а также с

развитием микроангиопатий (что также подтверждается результатами наших исследований).

В свою очередь, при обследовании пациентов с LADA со стажем заболевания более 4-х лет мы отмечали наличие микроангиопатий (табл. 4), протекающих на фоне повышенной продукции цитокинов, а также увеличенного числа лимфоцитов в крови, презентующих к ним рецепторы. Кроме того, необходимо отметить, что у больных данной клинической группы наблюдения наличие диабетических микроангиопатий было ассоциировано с резким снижением секреции С-пептида (табл. 5, рис. 2, 3), а, следовательно, и уровня инсулина [Evans J.L. et al., 2003; Galuska D. et al., 2011; Maciejwska-Jeske M. et al., 2011]. По-видимому, более раннее развитие диабетических микроангиопатий при LADA (подобно СД2), по сравнению с СД1 (табл. 4) может быть следствием описанных выше иммуно-метаболических нарушений.

Таким образом, полученные нами результаты, с одной стороны, подчеркивают патогенетическую тождественность СД1 и LADA как аутоиммунных вариантов сахарного диабета, а, с другой стороны, выявляют особенности развития данных форм диабета, связанные с участием в их патогенезе цитокинов с провоспалительными и цитотоксическими свойствами (IL-2, IL-4 и TNF α). По-видимому, активность гуморального иммунного ответа и дисбаланс системы цитокинов ведут к длительному поддержанию антигенной нагрузки, но более благоприятному течению аутоиммунного инсулита при LADA на ранних этапах его развития. В последующем, вероятно, нестабильный гормонально-метаболический статус приводит к вторичной активации системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α , что вносит свой вклад в темпы появления сосудистых осложнений у пациентов с LADA. Преобладание клеточного типа иммунного ответа при СД1 в комплексе с особенностями состояния системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α способствует быстрой потере способности поджелудочной железы к продукции инсулина. На этапе развития микроангиопатий у данных

пациентов вовлеченность цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α оказывается менее выраженной, чем при LADA, что, очевидно, связано с меньшей антигенной нагрузкой.

4.2 Роль системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в механизмах развития аутоиммунных тиреопатий

Развитие аутоиммунных тиреопатий представляет собой сложный процесс, состоящий из многостадийного взаимодействия между иммунокомпетентными клетками, инфильтрирующими щитовидную железу, и тиреоцитами с участием различных молекул адгезии, тканеспецифических антител и цитокинов [Глазанова Т.В. и соавт., 2000; Stassi G., Mada R., 2002; Swain M. et al., 2005; Jiskra J. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт., 2011].

В опубликованных работах различных авторов указывается на связь наличия аутоиммунных заболеваний и снижения количества лимфоцитов в крови, вклад генетических факторов в их развитие [Schulze-Koops H., 2004; Sommandas V. et al., 2005; Villa A. et al., 2008; Lim M.K. et al., 2009; Avila E.M. et al., 2010; Bahr J. et al., 2011]. Это также было отмечено нами при оценке показателей, характеризующих иммунную систему при сахарном диабете (табл. 7) и тиреопатиях (табл. 8). Однако анализ данных литературы показывает, что точный набор генов, ответственных за развитие лимфоцитопении при аутоиммунных тиреопатиях, не установлен.

Гистологическое изучение ЩЖ как при АИТ, так и при БГ выявляет обширную инфильтрацию органа лимфоцитами, плазматическими клетками и макрофагами [Stassi G., Mada R., 2002; Swain M. et al., 2005; Кандроп В.И., 2008; Poncin S. et al., 2008]. Выявленное в настоящем исследовании снижение общего количества циркулирующих лимфоцитов крови (табл. 8) у пациентов всех групп наблюдения, по сравнению с таковыми у здоровых лиц, отчасти, может быть связано с механизмами перераспределения лимфоцитов и миграцией клеток данной популяции в ткань щитовидной железы с формированием лимфоидного инфильтрата.

Однако, как показали результаты настоящего исследования, изменения субпопуляционного состава лимфоцитов при АИТ и БГ были выражены в разной степени (табл. 8). Аутоиммунный тиреоидит в фазе эутиреоза характеризовался повышением относительного количества Т-лимфоцитов в крови, а также абсолютного числа Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (относительно соответствующих показателей у здоровых доноров) (табл. 8). Исследования последних лет показывают, что от содержания CD8⁺-лимфоцитов и их функциональной активности зависит течение воспалительного процесса при аутоиммунных тиреопатиях [Дрометр Д.А. и соавт., 2007; Fang Y. et al., 2008]. CD8⁺-клеточную цитотоксичность можно рассматривать в качестве одной из ведущих причин гибели тиреоцитов при АИТ, что связано с их цитокинпродуцирующей активностью [Weetman A.P., 2004; Дрометр Д.А. и соавт., 2007] и способностью индуцировать апоптоз фолликулярных клеток ЩЖ [Stassi G., Mada R., 2002; Stojanovic J., 2009].

Роль Th-лимфоцитов в патогенезе тиреопатий, по данным литературы, заключается в продукции иммунорегуляторных цитокинов, влияющих на выраженность клеточных и гуморальных иммунных реакций [Nielsen C.H. et al., 2007; Poncin S. et al., 2008]. Нами установлено, что в крови у пациентов с АИТ повышено (по сравнению со здоровыми лицами) количество лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4 (табл. 15), что можно рассматривать, как признак активации Th2-пути иммунного ответа. Известно, что Th2-клоны лимфоцитов участвуют в контроле производства аутоантител плазматическими клетками. По итогам настоящего исследования, у больных АИТ в состоянии эутиреоза закономерно был выявлен высокий уровень антител к ТПО (табл. 10), для которых установлена способность индуцировать деструктивные процессы в фолликулярном эпителии ЩЖ [Исаева М.А. и соавт., 2007; Андреева А.В. и соавт., 2011], способствуя развитию гипотиреоза. Кроме того, С.Н. Nielsen et al. (2007) в эксперименте было показано, что мононуклеарные лейкоциты крови продуцируют

повышенное количество цитокинов (в частности, TNF α и IL-4) при культивировании в присутствии сыворотки крови, содержащей высокие титры антител к структурам ЩЖ. Это указывает на определенную роль аутоантител в стимуляции иммунокомпетентных клеток к продукции цитокинов, которые впоследствии способствуют CD4⁺-клеточной пролиферации при аутоиммунном тиреоидите.

У пациентов с БГ в состоянии эутиреоза нами было обнаружено повышение процента Т-лимфоцитов в крови (табл. 8), сочетающееся с увеличением количества лимфоцитов, несущих рецептор к IL-4, по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров (табл. 15). Очевидно, что CD124⁺-лимфоциты при БГ, как и при АИТ, участвуют в Т-зависимой В-клеточной активации, ведущей к продукции аутоантител. Как показывают результаты наших исследований, при БГ в фазе эутиреоза в крови определяются повышенный уровень антител к ТПО и рецептору ТТГ (табл. 10). Это указывает на то, что при данном заболевании в ЩЖ сочетаются процессы активации гормон-продуцирующей функции фолликулярных клеток за счет стимулирующего действия аутоантител к рТТГ [Исаева М.А. и соавт., 2007; Anvari M. et al., 2010] и гибели тиреоцитов, вызванной анти-ТПО-зависимой цитотоксичностью [Кандрор В.И., 2006; Исаева М.А. и соавт., 2007; Андреева А.В. и соавт., 2011]. Другой особенностью БГ, выявленной в настоящем исследовании, оказалось снижение (по сравнению с контрольной группой, а также группой больных АИТ) количества лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-2 (табл. 14). Опираясь на данные литературы, указывающие на увеличение концентрации растворимого рецептора к IL-2 как в сыворотке крови, так и в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при БГ [Miyachi S. et al., 2000; Komorowski J., 2001; Jiskra J. et al., 2009], можно предположить, что в данном случае имеет место повышенный шеддинг рецепторов к IL-2 с мембраны лимфоцитов. Однако молекулярные механизмы этого процесса не раскрыты. Поскольку взаимодействие IL-2 с комплементарными ему рецепторами на

поверхности лимфоцитов является важным элементом активации клеточного звена иммунного ответа, направленного на деструкцию фолликулярных клеток ЩЖ, то снижение количества $CD25^+$ -лимфоцитов (в сочетании с повышением числа $CD124^+$ -лимфоцитов) при БГ можно рассматривать, на наш взгляд, в качестве фактора, способствующего большей сохранности тиреоцитов, чем при АИТ.

Помимо этого, при сравнении субпопуляционного состава лимфоцитов крови и уровня аутоантител к ТПО между пациентами с АИТ и БГ в состоянии эутиреоза нами было выявлено повышение числа $CD8^+$ и $CD4^+$ и значительно увеличенное содержание в крови антител к ТПО у больных аутоиммунным тиреоидитом (табл. 8, 10). Это дополнительно подчеркивает преобладание цитотоксических компонентов аутоиммунного воспалительного ответа, направленного против ткани ЩЖ при АИТ.

В то же время, как при АИТ, так и при БГ мы выявили абсолютный дефицит циркулирующих в крови НК-лимфоцитов (табл. 8). Снижение численности в крови популяции циркулирующих НК-клеток, а также угнетение их функциональной активности при аутоиммунных тиреопатиях отмечено и другими исследователями [Wenzel B. et al., 1998; Solerte S.B. 2005; Liu R. et al., 2006]. Предполагается, что данный феномен способствует потере иммунологического контроля над аутореактивными клонами лимфоцитов и их выживанию [Fort M.M. et al., 1998; Liu R. et al., 2006], что во многом определяет активность формирования аутоиммунного процесса при АИТ и БГ.

Особое место в развитии аутоиммунных тиреопатий отводится системе $TNF\alpha$ [LaBue M. et al., 2004; Miossec P., 2005; Chen K. et al., 2007; Anvari M. et al., 2010; Vujanovic N.L., 2011]. Являясь типичным провоспалительным цитокином, $TNF\alpha$ обладает способностью стимулировать пролиферацию аутореактивных лимфоцитов различных классов, вызывать не типичную в норме экспрессию молекул адгезии и антигенов гистосовместимости (HLA) II класса на поверхности тиреоцитов [Komorowski J., 2001; Swain M. et al.,

2005; Дрометр Д.А. и соавт., 2007], а также индуцировать апоптоз иммунных и тиреоидных клеток [Bretz J., Baker J.R., 2001; Nakahara M. et al., 2009].

По результатам настоящего исследования, было отмечено угнетение базальной и митоген-стимулированной продукции *in vitro* TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови, снижение концентрации растворимого рецептора первого типа к TNF α в культуральных средах и количества CD120⁺-презентирующих лимфоцитов в крови при АИТ и БГ по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц (табл. 16, 17).

Спецификой аутоиммунного воспаления ЩЖ является то, что, помимо моноцитов и антигенспецифичных Т-лимфоцитов крови, продуцировать TNF α и презентировать комплементарные ему рецепторы способны фолликулярные клетки щитовидной железы [Komorowski J., 2001; Diez J.J. et al., 2002; Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002; Jiskra J. et al., 2009; Anvari M. et al., 2010] (табл. 21). В результате этого в очаге воспаления при аутоиммунных заболеваниях ЩЖ реализуется сложная система межклеточных взаимодействий, результатом которых может явиться гибель как тиреоцитов, так и аутореактивных клонов лимфоцитов. Известно, что при взаимодействии TNF α с комплементарным ему мембранным рецептором первого типа запускаются сигнальные пути активации MAP-киназ и транскрипционного фактора NF-kB, контролирующие реакции синтеза цитокинов, а также запуск программы апоптоза клетки [Miossec P., 2005; Chen K. et al., 2007; Vujanovic N.L., 2011].

М. LaVue et al. (2004) показано, что одним из механизмов, ограничивающим цитотоксическое воздействие TNF α на клетки ЩЖ, является повышенная продукция тиреоцитами sTNF-R1 – блокатора действия цитокина. Данный процесс реализуется посредством альтернативного сплайсинга растворимой формы рецептора к TNF α через активацию протеинкиназы С.

Особенности продукции цитокинов в ткани щитовидной железы
[по данным A.P. Weetman, R.A. Ajjan, 2002]

Цитокин	Источники продукции	Функциональные эффекты
IL-1	Фолликулярный эпителий, моноциты	Стимулирует экспрессию Fas-рецептора; ингибирует NIS/захват йода
IL-2	Лимфоциты	Стимулирует пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов
IL-4	Лимфоциты	Усиливает антигенспецифическую стимуляцию В-лимфоцитов, инфильтрирующих железу
IL-6	Лимфоциты, фолликулярный эпителий	Увеличивает пролиферацию тиреоцитов
IFN γ	Лимфоциты	Угнетает пролиферацию тиреоцитов; ингибирует NIS/захват йода; модулирует экспрессию гена рецептора ТТГ
TNF α	Лимфоциты, фолликулярный эпителий	Угнетает пролиферацию тиреоцитов; ингибирует NIS/захват йода

При аутоиммунных заболеваниях ЩЖ также запускаются механизмы, способствующие выживанию аутореактивных клонов лимфоцитов в очаге воспаления. В связи с этим, обнаруженное нами уменьшение количества CD120⁺-лимфоцитов и снижение концентрации sTNF-R1 при АИТ и БГ, возможно, следует трактовать как отражение процессов, направленных на ограничение TNF α -индуцированного рецептор-опосредованного апоптоза аутореактивных лимфоцитов и поддержание воспалительного процесса в щитовидной железе.

Кроме того, нельзя исключить, что выявленное в настоящей работе угнетение продукции моноклеарными лейкоцитами TNF α в условиях *in vitro* при отсутствии стимулирующих сигналов и при добавлении митогена,

уменьшение концентрации sTNF-R1 в супернатантах клеточных культур и числа CD120⁺-лимфоцитов связано с тем, что циркулирующие в крови лимфоциты находятся в состоянии сниженной функциональной активности, в то время как активно функционирующие клетки локализованы в очаге воспаления.

Аутоиммунное воспаление, протекающее в ЩЖ, тесно связано с уровнем продукции тиреоидных гормонов. С одной стороны, доминирующие в клинической картине синдромы гипотиреоза при АИТ и гипертиреоза при БГ развиваются за счет воздействия на тиреоциты специфического комплекса клеточных и гуморальных иммунных реакций [Кандрор В.И., 2006, 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Carra M. et al., 2011]. С другой стороны, измененный фон тиреоидных гормонов способен влиять на функциональные свойства иммунокомпетентных клеток [Botella-Carretero J. et al., 2005; Hodkinson C.F. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт., 2011].

У пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза ряд показателей, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов крови и цитокиновый статус, соответствовал иммунологической картине больных, находившихся в эутиреоидном состоянии. В частности, определялось повышение в крови количества цитотоксических лимфоцитов, Th-клеток, снижение содержания NK-лимфоцитов (табл. 8), по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров. Было выявлено уменьшение концентрации sTNF-R1 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и числа циркулирующих CD120⁺-лимфоцитов (табл. 16), по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров. Гипотиреоидное состояние отличало снижение количества Т- и В-лимфоцитов в крови, более выраженное уменьшение содержания циркулирующих NK-клеток (табл. 8), а также снижение концентрации IL-2 в супернатантах клеточных культур (табл. 14), по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с АИТ, находившихся

в состоянии эутиреоза. В то же время, концентрация аутоантител к ТПО в зависимости от функционального состояния ЩЖ не изменялась (табл. 10).

По данным литературы известно, что в физиологических концентрациях тиреоидные гормоны стимулируют клеточные иммунные реакции. Рецепторы к тиреоидным гормонам обнаружены в ядрах и митохондриях гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов [Dorshkind K., Horseman N.D., 2000; Botella-Carretero J. et al., 2005; Ланин Д.В. и соавт. 2011]. В экспериментальных работах на мышах, лишенных генов, кодирующих тиреоидные рецепторы, обнаружено снижение числа Т- и В-лимфоцитов в селезенке [Arpin C. et al., 2000]. Полученные нами результаты показали, что гипотиреоидное состояние ассоциировано со снижением количества В-лимфоцитов и натуральных киллеров в периферической крови (табл. 8), а также с уменьшением концентрации ИЛ-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов (табл. 14). Наряду с этим, повышенные концентрации аутоантител указывают на то, что при АИТ уровень антигенной нагрузки и напряженность иммунного ответа поддерживаются на высоком уровне, независимо от гормонального статуса.

По результатам различных клинических и экспериментальных исследований установлено, что повышенные концентрации Т₃ и Т₄ способны оказывать стимулирующее действие на антителогенез и реакции гуморального звена иммунного ответа, а также влиять на содержание Th1-клеток и цитотоксических лимфоцитов в крови [Красных М.С. и соавт., 2004; Botella-Carretero J. et al., 2005; Hodkinson C.F. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт. 2011].

Проведенное нами исследование показало, что гипертиреоидное состояние у пациентов с БГ отличалось от состояния эутиреоза более высокой продукцией мононуклеарными лейкоцитами ИЛ-2 (табл. 14), а также значительно повышенной концентрацией антител к ТПО и рТТГ (табл. 17). При этом, как и в фазе эутиреоза, гипертиреоз протекал на фоне увеличенного относительного содержания Т-клеток, повышенного

абсолютного количества цитотоксических и Th-лимфоцитов, а также дефицита NK-клеток (табл. 8) (по сравнению со здоровыми донорами).

Существуют данные о том, что повышенное содержание в крови свободного T_3 ведет к угнетению апоптоза лимфоцитов и стимуляции пролиферации данной популяции клеток [Hodkinson C.F. et al., 2009]. При БГ подобные процессы могут способствовать выживанию аутореактивных клонов лимфоцитов и поддержанию аутоиммунного воспаления в ткани ЩЖ. Наряду с этим, повышенная функциональная активность ЩЖ при БГ потенцирует иммунные реакции гуморального звена иммунитета, что подтверждается индукцией антителогенеза, а также выявленном в настоящем исследовании увеличении числа лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4, относительно их количества у здоровых лиц (табл. 15).

Как уже было отмечено, тироксин способен стимулировать реакции клеточной составляющей иммунного ответа. Существуют данные о том, что действие гормона направлено на стимуляцию Th1-лимфоцитов [Красных М.С. и соавт., 2004]. Следствием этого процесса может являться обнаруженная в ходе нашей работы повышенная продукция мононуклеарными лейкоцитами IL-2 (табл. 14). Следует также отметить, что, как и в состоянии эутиреоза, при тиреотоксикозе у пациентов с БГ нами было зарегистрировано снижение количества лимфоцитов, несущих рецептор к IL-2 (табл. 14), по сравнению с их числом у здоровых доноров. По данным литературы, при БГ у пациентов в состоянии гипертиреоза в сыворотке крови повышается концентрация растворимой фракции рецептора к IL-2 [Botella-Carretero J. et al., 2005], способной в незначительных количествах связывать свободный цитокин. Вероятно, это в некоторой степени ограничивает клеточно-опосредованные иммунные процессы, направленные против аутоантигенов фолликулярного эпителия ЩЖ.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что при аутоиммунных тиреопатиях существует дисбаланс в системе цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α . Изменения продукции данных цитокинов и

количества лимфоцитов, несущих комплементарные им рецепторы, определяют вовлеченность клеточных и гуморальных компонентов иммунного ответа в патогенез АИТ и БГ в состоянии эутиреоза и на фоне нарушенной продукции тиреоидных гормонов. Кроме того, в ходе настоящего исследования подтверждено участие Th2-пути иммунного ответа, ассоциированного с продукцией аутоантител к структурам фолликулярного эпителия, не только при БГ, но и при АИТ. Это подчеркивает отсутствие строгой поляризации иммунного ответа по Th1-типу при аутоиммунном тиреоидите. При этом преобладание деструкции фолликулярных клеток при АИТ связано с цитотоксическим воздействием аутоантител и иммунных клеток, тогда как при БГ сочетаются процессы цитотоксического влияния лимфоцитов на тиреоциты и механизмы стимуляции функции щитовидной железы, связанные со спецификой действия антител к рТТГ.

4.3 Общие закономерности и особенности цитокиноопосредованных механизмов дисрегуляции иммунной системы при эндокринопатиях аутоиммунного генеза

Производство цитокинов иммунокомпетентными клетками тесным образом связано с поддержанием воспаления при аутоиммунном повреждении органов. Как отмечалось ранее, цитокины, обладая способностью влиять на пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток, обеспечивать миграцию лимфоидных клеток и межклеточную кооперацию, регулируют иммунные процессы в очаге воспаления [Firestein G. et al., 2006; Poncin S. et al., 2008; Stojanovic J., 2009; Grinberg-Bleyer Y. et al., 2010; Vujanovic N.L., 2011].

Результаты проведенной нами детальной оценки вовлеченности системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α в развитие аутоиммунных эндокринопатий показывают, что дисбаланс цитокинопродукции является ключевым фактором иммунопатогенеза аутоиммунного СД и аутоиммунных тиреопатий (табл. 11-17, 19, 20). Цитокины (в частности, IL-2, IL-4 и TNF α) относятся к антигеннеспецифическим факторам иммунного ответа, поэтому

их регуляторное и цитотоксическое действие находит отражение в патогенезе заболеваний, являющихся предметом нашего исследования.

Развитие иммунного ответа на аутоантигены органа-мишени сопряжено с активацией клеточного и гуморального звеньев иммунитета. К числу цитокинов, регулирующих этот процесс, относятся IL-2 и IL-4 [Ярилин А.А., 2010]. По итогам выполненных нами исследований показано, что концентрация IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов явилась показателем, оказывающим значимый вклад в патогенез аутоиммунного СД и аутоиммунных тиреопатий (табл. 11, 14, 19, 20). Наиболее выраженные изменения продукции IL-2 культурой мононуклеарных лейкоцитов и числа лимфоцитов, презентующих к нему рецепторы, были связаны с наличием диабетических микроангиопатий у пациентов с СД и с состоянием дистиреоза у больных аутоиммунными тиреопатиями. При этом у всех обследованных нами пациентов (за исключением больных LADA с микроангиопатиями) был выявлен дисбаланс, связанный с увеличением количества лимфоцитов в крови, презентующих рецептор к IL-4, при отсутствии изменений продукции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами крови (табл. 12, 15).

Известно, что параллельно с началом формирования специфического иммунного ответа должны развиваться индуцибельные (врожденные) иммунные реакции, не связанные с предварительной дифференцировкой лимфоцитов [Ярилин А.А., 2010]. При комплексном сравнении субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями обращало на себя внимание снижение содержания циркулирующих NK-клеток ($CD16^+CD56^{low}$) как при сахарном диабете, так и при тиреопатиях. Поскольку NK-лимфоциты являются иммунорегуляторными клетками звена врожденного иммунитета организма [Jaeger B.N., Vivier E., 2012; Nielsen N. et al., 2012], то недостаток их количества может отягощать аутореактивное повреждение поджелудочной и щитовидной желез. Опираясь на данные собственных исследований, можно

предположить, что снижение количества НК-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) (табл. 7), а также определялось при АИТ и БГ, не зависимо от уровня тиреоидных гормонов (табл. 8).

В то же время, проведенный нами дискриминантный анализ данных показал, что при тиреопатиях количество натуральных киллеров не только оказалось в числе наиболее информативных показателей, связанных с развитием заболевания, но и вносило в него максимальный вклад (наряду с количеством Т-лимфоцитов) (табл. 20). Причиной подобной тесной связи недостаточности одного из компонентов врожденного иммунного ответа (НК-клеток) с развитием именно аутоиммунных тиреопатий, на наш взгляд, может быть анатомическая близость щитовидной железы к лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой носоглотки. Снижение цитотоксичности по отношению к внутриклеточно расположенным патогенам может создавать благоприятные условия для возникновения аутоиммунного интратиреоидного воспаления под влиянием триггерных инфекций (парвовирусов, вирусов Коксаки, семейств вируса герпеса и др.) [Mori K., Yoshida K., 2010]. Дополнительно к этому в условиях сниженного количества $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов, вероятно, утрачивается контроль над аутореактивными клонами лимфоцитов, активируется Т-клеточное звено иммунитета.

Значимым звеном патогенеза аутоиммунного поражения поджелудочной и щитовидной железы, по результатам наших исследований, оказалось нарушение продукции моноклеарными лейкоцитами $TNF\alpha$ (табл. 19, 20). В дополнение к уже рассмотренным особенностям состояния системы данного цитокина, связанными, в частности, с источниками продукции $TNF\alpha$ при СД и тиреопатиях, необходимо отметить следующее. По данным литературы, кроме цитотоксического воздействия на клетки-

мишени, в очаге воспаления реализуются универсальные механизмы местного влияния TNF α на проницаемость сосудов, адгезию моноцитов, макрофагов и нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и тиреоцитам [Uno S. et al., 2007; Макарова В.И, Макаров А.И., 2008]. При оценке состояния системы TNF α было показано также, что при сахарном диабете и тиреопатиях аутоиммунного генеза в культуральных средах снижена концентрация растворимой формы рецептора к TNF α 1 типа (табл. 13, 16-17). При этом, учитывая данные о концентрации TNF α в супернатантах клеточных культур и количестве лимфоцитов в крови, несущих мембраносвязанный рецептор к TNF α , можно предположить, что механизмы снижения концентрации растворимого рецептора к TNF α при сахарном диабете и тиреопатиях различны. Не исключено, что при СД имеет место затруднение шеддинга рецепторов с поверхности мембраны или альтернативного сплайсинга рецептора [Уткин О.В., Новиков В.В., 2007], в то время как при тиреопатиях низкие концентрации sTNF-R1 являются следствием снижения пула циркулирующих в крови CD120⁺-лимфоцитов, что было отмечено в нашем исследовании (табл. 16).

Таким образом, просматривается определенная общность цитокиноопосредованных механизмов развития аутоиммунного воспаления поджелудочной и щитовидной железы. В то же время, вклад иммунологических компонентов в патогенез аутоиммунного СД и аутоиммунных тиреопатий различен, что отражает особенности иммунопатогенеза эндокринопатий на этапах прогрессирования и формирования функциональной недостаточности органа-мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные исследования во многом сосредоточены на выявлении механизмов срыва аутоотолерантности, поиске общих и специфических звеньев патогенеза различных аутоиммунных заболеваний. К числу ключевых патогенетически значимых факторов органоспецифических

аутоиммунных заболеваний относится дисбаланс продукции цитокинов. Данные биологически активные молекулы опосредуют межклеточные взаимодействия иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления, влияя на выраженность клеточного и гуморального иммунного ответа, а также оказывают непосредственное повреждающее действие на клетки органа-мишени.

В проведенной нами работе показано, что развитие аутоиммунных эндокринопатий ассоциировано с дисбалансом цитокиновой сети, проявляющимся в нарушении продукции иммунными клетками IL-2, IL-4, TNF α и изменении количества лимфоцитов в крови, презентующих к ним рецепторы. Очевидно, что нарушения баланса в системе цитокинов являются одним из факторов, способствующих поддержанию воспалительного процесса (рис. 5). Оценка состояния системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α при эндокринопатиях аутоиммунного генеза подтвердила предположение об отсутствии строгой поляризации иммунного ответа по Th1-пути при СД1 и АИТ, а также по Th2-пути при LADA и БГ (как предполагалось другими исследователями) [Кандроп В.И., 2008; Dardalhon V., 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2010]. При всех эндокринопатиях аутоиммунного генеза были выявлены признаки вовлеченности цитокинов, присущих обоим типам Th-лимфоцитов, но разной степени выраженности.

Представленные в настоящем исследовании результаты сравнительного анализа состояния системы цитокинов IL-2, IL-4 и TNF α и их рецепторов у пациентов с аутоиммунным СД в зависимости от наличия микроангиопатий, а также у больных с аутоиммунными тиреопатиями в зависимости от тиреоидного статуса свидетельствуют о существовании ряда закономерностей и особенностей развития заболеваний. Необходимо отметить, что, помимо цитокиноопосредованных механизмов, особенности клинического течения эндокринопатий аутоиммунного генеза определяются

функциональными свойствами органоспецифических антител, а также их концентрацией (рис. 5).

Дальнейшее изучение механизмов дизрегуляции иммунной системы при аутоиммунных эндокринопатиях, по нашему мнению, может быть сконцентрировано на более детальных механизмах участия IL-2 в развитии СД, а также роли клеточного звена иммунитета в формировании аутоиммунных тиреопатий на этапе их индукции и прогрессирования. При этом важна разработка диагностических подходов к оценке функционального состояния иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления. Это позволит сформировать комплекс диагностических маркеров и мишеней для патогенетически обоснованной терапии аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий.

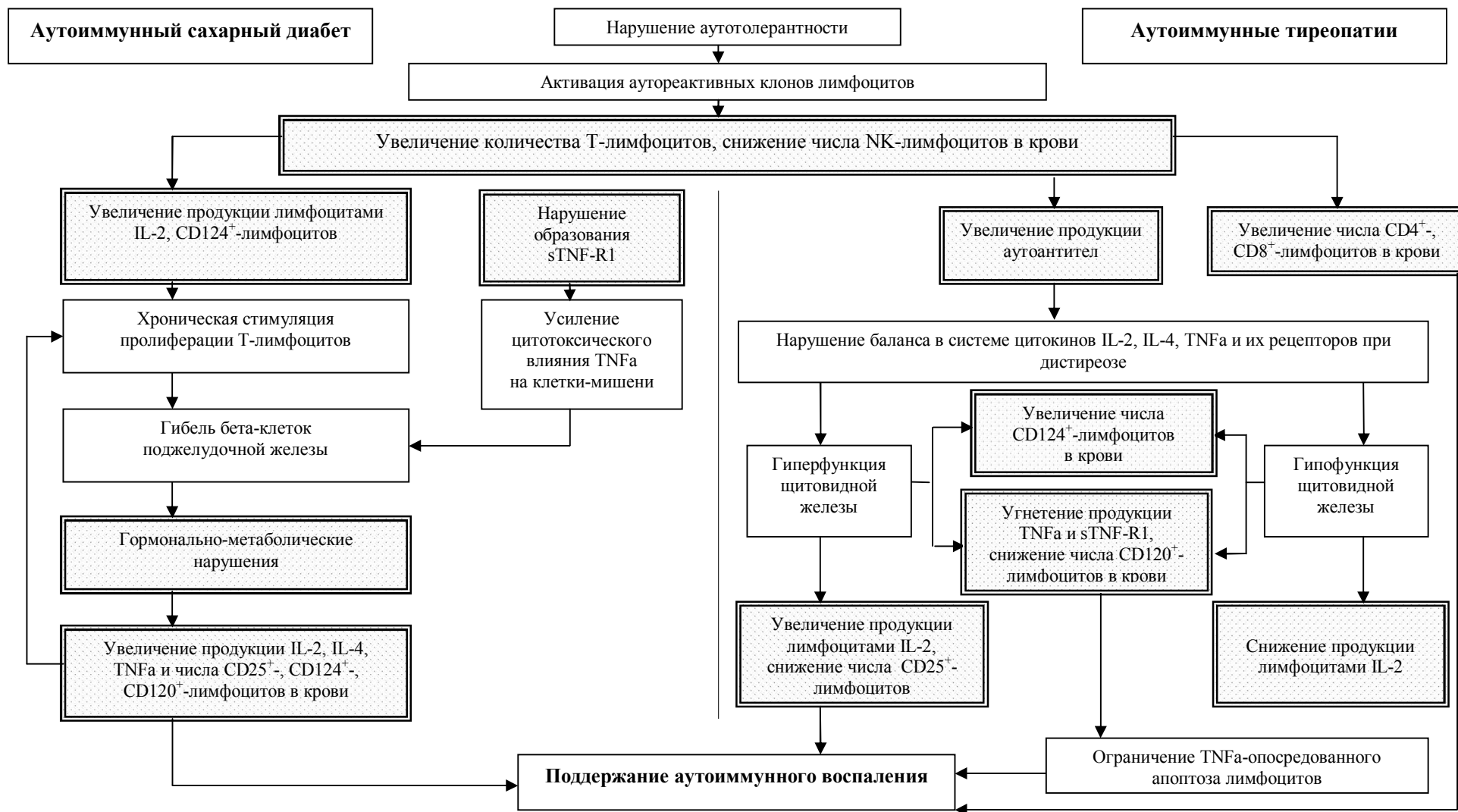


Рис. 5. Цитокиноопосредованные механизмы развития аутоиммунных эндокринопатий [по данным A.G. Gianoukakis et al., 2008; H. Korf et al., 2010; Е.А. Ретиной, 2010; А.В. Андреевой и соавт., 2011 и результатам собственных исследований (выделено серым)]

ВЫВОДЫ

1. При аутоиммунном повреждении поджелудочной и щитовидной желез нарушения в клеточном и гуморальном звеньях иммунной системы проявляются изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов, повышением концентрации органоспецифических аутоантител в крови, а также нарушениями системы цитокинов как Th1- (IL-2, TNF α), так и Th2-профиля (IL-4).
2. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в крови при аутоиммунном повреждении поджелудочной и щитовидной желез являются однонаправленными, характеризуются повышением содержания CD3⁺-лимфоцитов при снижении количества CD16⁺CD56^{low}-клеток у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза (сахарный диабет 1 типа, латентный аутоиммунный диабет взрослых) независимо от наличия нефро- или ретинопатии и у больных аутоиммунными тиреопатиями (аутоиммунный тиреоидит и болезнь Грейвса) в состоянии эутиреоза, гипертиреоза.
3. Концентрация органоспецифических антител к поверхностному антигену β -клетки, декарбоксилазе глутаминовой кислоты в крови у больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза увеличивается более выражено при латентном аутоиммунном диабете взрослых и не зависит от наличия микроангиопатий; концентрация в крови аутоантител к тиреоидной пероксидазе и рецептору тиреотропного гормона не зависит от функционального состояния щитовидной железы у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и возрастает у пациентов с болезнью Грейвса в фазе гипертиреоза.
4. Продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови и количество CD25-позитивных лимфоцитов у больных сахарным диабетом аутоиммунного генеза с нефро- или ретинопатий превышают таковые у пациентов без микроангиопатий. Концентрация IL-2 в супернатантах

культур мононуклеарных лейкоцитов больных аутоиммунными тиреопатиями при гипотиреозе снижена, при гипертиреозе, напротив, превышает норму и соответствующие уровни при эутиреозе (на фоне сниженного количества лимфоцитов в крови, несущих CD25).

5. Дисбаланс в системе «лиганд-рецептор» IL-4 у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом (латентный аутоиммунный диабет взрослых без микроангиопатий, сахарный диабет 1 типа) и аутоиммунными тиреопатиями (аутоиммунный тиреоидит и болезнь Грейвса) обусловлен повышением количества CD124-позитивных лимфоцитов при неизменной продукции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами крови. Особенности функциональной активности лимфоцитов у больных латентным аутоиммунным диабетом взрослых с микроангиопатиями являются повышенное количество CD124-позитивных лимфоцитов и высокий уровень продукции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами крови.
6. Особенности состояния системы TNF α (цитокин, мембраносвязанная и растворимая формы рецепторов) зависят от клинической формы аутоиммунных эндокринопатий. Концентрация растворимого рецептора к TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов снижается при всех вариантах аутоиммунного сахарного диабета; у больных латентным аутоиммунным диабетом взрослых с микроангиопатиями повышаются продукция TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови и количество CD120-позитивных лимфоцитов. Аутоиммунные тиреопатии (независимо от функционального состояния щитовидной железы) характеризуются угнетением продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови, растворимого рецептора к TNF α и снижением числа CD120-позитивных лимфоцитов в крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аутоантитела различных уровней специфичности и функциональности в патогенезе и диагностике аутоиммунных заболеваний щитовидной железы / М.А. Исаева, З.И. Богатырева, Е.Н. Сучкова и др // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2007. – Т.3, № 4. – С. 27-34.
2. Афифи, А. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ / А. Афифи, С. Эйзен. – М.: Мир, 1982. – 488 с.
3. Балаболкин, М.И. Возможна ли патогенетическая терапия сахарного диабета 2-го типа / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т.54, №5. – С.50-56.
4. Болезни щитовидной железы / под ред. Л.И. Браверманна. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
5. Геворкян, А.Г. Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса больных диффузным токсическим зобом и аутоиммунным тиреоидитом / А.Г. Геворкян, А.С. Цогоев, Л.З. Болиева // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – № 3. – С. 155-156.
6. Геномика – медицине / В.И. Иванов, Л.Л. Киселев – М.: Академкнига, 2005. – 392 с.
7. Глазанова, Т.В. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы: роль иммунологических и иммуногенетических факторов / Т.В. Глазанова, Л.Н. Бубнова, В.И. Мазуров // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 257-270.
8. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // пер. с англ. – М.: Прайма, 1998. – 459 с.
9. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов – Томск, 1992. – 272 с.
10. Дамбаева, И.М. Иммунный статус больных аутоиммунными

- заболеваниями щитовидной железы / И.М. Дамбаева, Д.Н. Санжеева, Т.Д. Шарапова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2007. – № 5. – С. 102-103.
11. Драник, Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология: учебник / Г.Н. Драник. – Одесса: «АстроПринт», 1999. – 603 с.
 12. Дрометр, Д.А. Иммунологические аспекты дифференциальной диагностики синдрома гипертиреоза / Д.А. Дрометр, И.А. Тузанкина, А.В. Кияев // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2007. – Т. 3, № 1. – С. 18-23.
 13. Зак, К.П. Цитокины и сахарный диабет 1-го типа у человека / К.П. Зак, В.В. Попова // Украинский медицинский часопис. – 2006. – №1. – С. 78-88.
 14. Занозина, О.В. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности / О.В. Занозина, Н.Н. Боровков, Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. – №3. – С. 104-112.
 15. Изменение иммунного статуса у больных диффузным токсическим зобом в динамике лечения тиреостатиками / А.А. Савченко, В.П. Мацынина, С.Г. Кадричева, С.А. Доганина // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23, № 1-3. – С. 30-33.
 16. К механизмам пролиферации и гибели тиреоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы / В.И. Кандрор, С.И. Крайнова, И.В. Крюкова, Н.А. Мкртумова // Вестник РАМН. – 2006. – № 9-10. – С. 56-60.
 17. Кандрор, В.И. Механизмы развития болезни Грейвса и действия тиреоидных гормонов / В.И. Кандрор // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2008. – Т.4, № 1. – С. 26-34.
 18. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 552 с.

19. Колесник, Ю.М. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 / Ю.М. Колесник, М.А. Орловский // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т.50, №2. – С. 3-10.
20. Комплементзависимая антитиреоидная цитотоксичность сывороток больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / С.И. Крайнова, И.В. Крюкова, Н.А. Мкртумова и др // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 7-11.
21. Красных, М.С. Влияние экзогенного тироксина на формирование гуморального и клеточноопосредованного иммунного ответа в период антигензависимого и антигеннезависимого этапов иммуногенеза / М.С. Красных, Б.А. Бахметьев, С.В. Ширшев // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, № 3-5. – С. 234.
22. Кулинский, В.И. Биохимические аспекты воспаления / В.И. Кулинский // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 6. – С. 733-746.
23. Кулинский, В.И. Молекулярные механизмы действия гормонов. Киназные системы. Системы с внутриклеточными рецепторами. Трансактивация сигнал-трансдукторных систем / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 4. – С. 391-405.
24. Ланин, Д.В. Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы / Д.В. Ланин, Н.В. Зайцева, О.В. Долгих // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 122-134.
25. Лебедев, К.А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: Медицинская книга, 2003. – с. 368.
26. Лебедев, Л.Р. Изучение цитокинового профиля при иммунизации геном интерлейкина-2 человека в составе рекомбинантной плазмиды / Л.Р. Лебедев, Л.Е. Булычев, И.В. Бабин // Иммунология. – 2007. – № 3. – С. 143-147.
27. Макарова, В.И. Роль цитокинов в реализации воспалительной реакции / В.И. Макарова, А.И. Макаров // Экология человека. – 2008. –

- №5. – С. 31-35.
28. Малышева, Н.А. Патогенез, диагностика и лечение диабетической ретинопатии у детей, больных сахарным диабетом 1 типа / Н.А. Малышева, Т.Е. Потемина // Медицинский альманах. – 2009. – №4. – С. 171-175.
29. Натвиг, Дж. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. / Дж. Натвиг, П. Перлманн, Х. Вигзель. – Москва, 1980. – 280 с.
30. Никонова, Т.В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа / Т. В. Никонова // Сахарный диабет. – 2006. – №3. – С. 59-64.
31. Один, В.И. Иммунопатофизиологические особенности и лабораторная диагностика сахарного диабета тип 1 / В.И. Один, В.Н. Цыган // Клинико-лабораторный консилиум. – 2009. – №4. – С. 45-53.
32. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.
33. Парахонский, А.П. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний / А.П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 4. – С. 63-64.
34. Пинегин, Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, А.В. Симонова // пособие для врачей-лаборантов. – М., 2001. – 65 с.
35. Популяция антитиреоидных аутоантител как источник антител различных уровней специфичности и функциональности: клиническая значимость феномена комбинаторики при мониторинге пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / А.В. Андреева, Е.Н. Сучкова, С.И. Гаджиева и др // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. 19-27.

36. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237-243.
37. Продукция некоторых цитокинов у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / Т.В. Глазанова, Л.Н. Бубнова, Е.М. Трунин и др // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 29-32.
38. Репина, Е.А. Механизмы адаптивного иммунитета (на модели сахарного диабета 1 типа) / Е.А. Репина // Сахарный диабет. – 2010. – №2. – С. 21-27.
39. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита / А.А. Новиков, Е.Н. Александрова, М.А. Диатроптова и др // Научно-практическая ревматология. – 2010. – №2. – С. 71-82.
40. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели β -клеток при различных вариантах течения сахарного диабета 1 типа / И.И. Дедов, Т.В. Никонова, О.М. Смирнова и др // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т.51, №2. – С. 3-7.
41. Сарвилина, И.В. Междисциплинарные исследования в медицине / И.В. Сарвилина, В.Н. Карпищенко, Ю.В. Горшкова. – М.: Техносфера, 2007. – 368 с.
42. Сахарный диабет: метаболические эффекты и окислительный стресс / И.Б. Заводник, И.К. Дремза, Е.А. Лапшина, В.Т. Чещевик // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 2. – С. 83-94.
43. Симбирцев, А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 9–16.
44. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-21.

45. Сисла, Б. Руководство по лабораторной гематологии / Сисла Б.// перевод с английского под общей редакцией А.И. Воробьева. – М.: практическая медицина, 2011. – 352 с.
46. Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты: сб. науч. тр. / под ред. С.В. Сенникова, В.А. Козлова. – Новосибирск, 2004. – 122 с.
47. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека / А.А. Тотолян, И.А. Балдуева, Л.Н. Бубнова и др // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 1. – С. 44-50.
48. Уткин, О.В. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК / О.В. Уткин, В.В. Новиков // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 13-20.
49. Фадеев, В.В. Болезнь Грейвса / В.В. Фадеев, Г.А. Мельниченко // Российский медицинский журнал [Электронный ресурс] – Электрон. журн. – 2005. – Вып. 353. – Режим доступа к журн.: www.rmj.ru
50. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: «Издательство БИНОМ-Пресс», 2006. – 256 с.
51. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2010. – 752 с.
52. A key role for ROCK in TNF α -mediated diabetic microvascular damage / R. Arita, S. Nakao, T. Kita et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2013. – Vol. 54(3)/ - P. 2373-2383.
53. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes / A.L. Corper, T. Stratmann, V. Apostolopoulos et al. // Science. – 2000. – Vol. 288(5465). – P. 505-511.
54. Aaronson, D.S. A road map for those who do not know JAK-STAT / D.S. Aaronson, C.M. Horvath // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 1653-1655.
55. Abnormal T cell autoimmunity against GAD65 in LADA patients / Y. Zhang, Z.G. Zhou, L. Yang et al. // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2010. – Vol. 90(28). – P. 1963-1965.

56. Abnormal T-cell activation caused by imbalance of the IL1/IL1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis / T. Matsuki, S. Nakae, K. Sudo et al. // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 194. – P. 873-881.
57. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency / C. Akesson, K. Uvebrant, C. Oderup et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2010. – Vol. 161. – P. 48-56.
58. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry / B. Berner, D. Akça, T. Jung et al. // *J. Rheumatol.* – 2000. – Vol. 27. – P. 1128-1135.
59. Antioxidative treatment reverses imbalance of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMF activation in diabetic rats / J. Bojuanga, B. Dresar-Mayert, K.-H. Usadel et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 316. – P. 771-780.
60. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction / J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1-8.
61. Arend, W.P. Cytokines and cellular interactions in inflammatory synovitis / W.P. Arend // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107, N 9. – P. 1081-1082.
62. Atkinson, M.A. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? / M.A. Atkinson, E.H. Leiter // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5. – P. 601-604.
63. Atkinson, M.A. Thirty years of investigating the Autoimmune basis for the type 1 diabetes / M.A. Atkinson // *Diabetes.* – 2005. – N 54. – P. 1253-1263.
64. Autoreactive T cells mediate NK cell degeneration in autoimmune disease / R. Liu, L. Van Kaer, A. La Cava et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 5247-5254.

65. B cell depletion in autoimmune diabetes: insights from murine models / J.L. Chamberlain, K. Attridge, C.J. Wang et al. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2011. – Vol. 15(6). – P. 703-14.
66. Barsouk, A. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against orbital target cells in thyroid-associated ophthalmopathy and related disorder; close relationship between serum cytotoxic antibodies and parameters of eye muscle dysfunction / A. Barsouk, K.A. Peele, J. Kiljanski // *J. Endocrinol. Invest.* – 1996. – Vol. 19(6). – P. 334-341.
67. Bayer, A.L. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells / A.L. Bayer, A. Yu, T.R. Malek // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178 (7). – P. 4062-4071.
68. Betterle, C. Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? / C. Betterle, F. Lazzarotto, F. Presotto // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 137. – P. 239-250.
69. Botella-Carretero, J.I. The effects of thyroid hormones on circulating markers of cell-mediated immune response, as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma before and during thyroxine withdrawal / J. I. Botella-Carretero, A. Prados, L. Manzano et al. // *European Journal of Endocrinology.* – 2005. – Vol. 153 – P. 223–230.
70. Bretz, J.D. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? / J.D. Bretz, J.R. Baker // *Clin. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 55, №1. – P. 1-11.
71. Bruun, C. Inhibitory effects of suppressor of cytokine signalling-3 on tumor necrosis factor-alpha induced signalling in pancreatic beta cells / C. Bruun, P.E. Heding, S.G. Ronn // *Diabetologia.* – 2005. – N 48. – P.181-189.
72. Bruun, C. Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells / C. Bruun, P.E. Heding, S.G. Ronn // *Mol Cell Endocrinol.* – 2009. – N 13. – P.32-38.

73. Buckner, J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+regulatory T cells in human autoimmune diseases / J.H. Buckner // *Nat.Rev.Immunol.* – 2010. – N 10. – P. 849-859.
74. Cappa, M. Autoimmune thyroid diseases in children / M. Cappa, C. Bizzarri, F. Crea // *J Thyroid Res.* – 2011. – PMC3010678.
75. Carel, J.C. Cyclosporine delays but does not prevent clinical onset in glucose intolerant pre-type 1 diabetic children / J.C. Carel, C. Boitard, G. Eisenbarth // *J Autoimmun.* – 1996. – Vol. 9(6). – P. 739-745.
76. Chang, Y. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice / Y. Chang, S.L. Piao, S. Gao, D.M. Zheng // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2005. – Vol. 34(1). – P.64–66.
77. Chen, M. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity / M. Chen, Z.D. Yang, K.M. Zmith // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48(3). – P. 486–495.
78. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes / C.D. Agardh, C.M. Cilio, A. Lethagen et al. // *J. Diabetes Complications.* – 2005. – Vol. 19(4). – P. 238-246.
79. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF therapy / M.R. Ehrenstein, J.G. Evans, A. Singh et al. // *Journal of Experimental Medicine.* – 2004. – Vol. 200, N 3. – P. 277-285.
80. C-peptid induces human renal mesangial cell proliferation in vitro, activating Src-kinase, PI-3 kinase and ERK1/2 / D. Vasic, A. Spyranis, R. Durst et al. // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2012. – Vol. 351. – P. 337-341.
81. C-peptide increases Na, K-ATPase expression via PKC- and MAP kinase-dependent activation of transcription factor ZEB in human renal tubular cells / D. Galuska, S. Pirkmajer, R. Barres et al. // *Pol. One.* – 2011. – Vol. 6 (12).
82. Culina, S. Pathogenic and regulatory T cells in type 1 diabetes: losing self-control, restoring it, and how to take the temperature / S. Culina, R. Mallone // *Curr Diab Rep.* – 2011. – Vol. 11. – P. 426–433.

83. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM / M.J. Hussain, J. Maher, T. Warnock et al. // *Diabetologia*. – 1998. – Vol. 41. – P. 343-349.
84. Cytotoxicity of CD56 (bright) NK cells is towards autologous activated CD4 T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A / N. Nielsen, N. Odum, B. Urso et al. // *PLoS. One*. – 2012. – Vol. 7(2).
85. Dalberg, U. Both Gmap5 and the diabetogenic BBDP allele of *Gimap5* induce apoptosis in T cells / U. Dalberg, H. Markholst, L. Hornum // *Int. immunol.* – 2007. – N 9. – P. 447-453.
86. Decker, T. Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins / T. Decker, P. Kovarik // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol. 55. – P. 1535-1546.
87. Decreasing TNF α results in less fibrosis and earlier resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis / K. Chen, Y. Wei, G.C. Sharp, H. Braley-Mullen // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 306-314.
88. Defective regulation of IFN-gamma and IL-12 by and endogenous IL-10 in progressive multiple sclerosis / K.E. Balashov, M. Comabella, T. Ohashi et al. // *Neurology*. – 2000. – Vol. 55. – P. 192-198.
89. Defective suppressor function in T-cells from patients with type 1 diabetes / S. Lindley, C.M. Dayan, A. Bishop et al. // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54, N 1. – P. 92-99.
90. Defective suppressor function of human regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II / M.A. Kriegel, T. Lohmann, C. Gabler et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2004. – Vol. 199, N 9. – P. 1285-1291.
91. Defects in differentiation of bone-marrow derived dendritic cells of the BB rat are partly associated with IDDM2 (the *lyp* gene) and partly associated with other genes in the genes in the BB rat background / V. Sommandas,

- E.A. Rutledge, B. Van Yserloo et al. // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 25. – P. 46-56.
92. Disruption of the STAT4 signaling pathway protects from autoimmune diabetes while retaining antiviral immune competence / A. Holz, A. Bot, B. Coon et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163. – P. 5374–5382.
93. Douglas, C. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, anfunction / C. Douglas, N.P. Palmerand, V. Restifo // *Trends. Immunol.* – 2009. – Vol. 30(12). – P. 592-602.
94. Effects of T3R alpha 1 and T3R alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development / C. Arpin, M. Pihlgren, A. Fraichard et al. // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164, N 1. – P. 152-160.
95. Eisenbarth, G.S. Autoimmune polyendocrine syndromes / G.S. Eisenbarth, P.A. Gottlieb // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – P. 2068-2079.
96. Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: news perspectives on disease pathogenesis and treatment / G.S. Eisenbarth, M.A. Atkinson // *Lancet.* – 2001. – N 358. – P. 221-229.
97. Eschler, D.C. Cutting edge: the etiology of autoimmune thyroid diseases / D.C. Eschler, A. Hasham, Y. Tomer // *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* – 2011. – Vol. 41 (2). – P. 190-197.
98. Expression of Immunoregulatory Molecules by Thyrocytes Protects Nonobese Diabetic-H2h4 Mice from Developing Autoimmune Thyroiditis / M. Nakahara, Y. Nagayama, O. Saitoh et al. // *Endocrinology.* – 2009. – V. 150. – P. 1545-1551.
99. Fang, Y. Interleukin-10 Promotes Resolution of Granulomatous Experimental Autoimmune Thyroiditis / Y. Fang, G.C. Sharp, H. Braley-Mullen // *The American Journal of Pathology.* – 2008. – Vol. 172, N. 6. – P.1591-1602.
100. Firestein, G. Rheumatoid Arthritis / G. Firestein, G. Panayiand, F. Wollheim // *Oxford University Press.* – 2006. – P. 173-192.

101. Fort, M.M. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis / M.M. Fort, M.W. Leach, D.M. Rennick // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P.3256-3261.
102. Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity / A. Liston, D. Gray, S. Lesage et al. // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 200. – P. 1015-1026.
103. Genetic dissection reveals diabetes loci proximal to the gimap5 lymphopenia gene / J.M. Fuller, M. Bogdani, T.D. Tupling et al. // *Physiol Genomics.* – 2009. – N 38. – P. 89-97.
104. Gianoukakis, A.G. Cytokines, Graves' Disease, and Thyroid-Associated Ophthalmopathy / A.G. Gianoukakis, N. Khadavi, T.J. Smith // *THYROID.* – 2008. – Vol. 18, N. 9 – P. 953-958.
105. Gonda, T.J. Activating mutations in cytokine receptors: implications for receptor function and role in disease / T.J. Gonda, R.J. D'Andrea // *Blood.* – 1997. – Vol. 89, N 2. – P. 355-369.
106. Graves disease and gene polymorphism of TNF- α , IL-2, IL6, IL-12 and IFN- γ / M. Anvari, O. Khalilzadeh, A. Esteghamati et al. // *Endocr.* – 2010. – Vol. 37. – P. 344-348.
107. Herold, K.C. Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3 γ 1(Ala-Ala) / K.C. Herold, J.B. Burton, F. Francois // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111(3). – P. 409-418.
108. Heterogeneity among patients with latent autoimmune diabetes in adults / T. Maruyama, T. Nakagawa, A. Kasuga, M. Murata // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2011. – Vol. 27. – P. 971-974.
109. Highly variable clinical phenotypes of hypomorphic RAG1 mutation / E.M. Avila, G. Uzel, A. Hsu et al. // *Pediatrics.* – 2010. – Vol. 126, N 5. – P. 1248-1252.
110. Hodkinson, C.F. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55–70 years / C.F.

- Hodkinson, E.A. Simpson, J.M. O'Connor et al. // *J Endocrinol.* – 2009. – Vol. 202 – P. 55-63.
111. Human autoantibodies modulate the T cell epitope repertoire but fail to unmask a pathogenic cryptic epitope / S. Quarantino, J. Ruf, M. Osman et al. // *J Immunol.* – 2005. – Vol. 174(1). – P. 557-563.
112. IAN5 polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus / M.K. Lim, D.H. Sheen, S.A. Kim et al. // *Lupus.* – 2009. – Vol. 18, N 12. – P. 1045-52.
113. Ibbm1 and Ibbm2 homozygous WOK.4BB rats develop lymphopenia, but no hyperglycemia like the BB/OK rats / J. Bahr, N. Follak, N. Kloting et al. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2011. – N 119. – P. 395-400.
114. Identification of HLA-DRB1 alleles associated with Graves' disease in Koreans by sequence-based typing / H.W. Jang, H.W. Shin, H.J. Cho et al. // *Immunol Invest.* – 2011. – Vol. 40(2). – P. 172-182.
115. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8⁺T cells in autoimmune disease / S.M. Lieberman, A.M. Evans, B. Han et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – N 100. – P. 8384-8388.
116. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis / X. Wang, M. Chen, K.P. Wandinger et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 548-557.
117. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination / B. Gran, G.X. Zhang, S. Yu et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 7104-7110.
118. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis / H. Rothe, A. Hausmann, K. Casteels et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163, N 3. – P. 1230-1236.

119. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells / Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, S. You et al. // *J Exp Med.* – 2010. – Vol. 207(9). – P. 1871-1878.
120. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naïve T-cells in human / S.V. Eijnden, S. Goriely, D. De Wit et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35. – P. 469-475.
121. Immunomodulation in type 1 diabetes by NBI-6024, an altered peptide ligand of the insulin B epitope / D.G. Alleva, R.A. Maki, A.L. Putna et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 63(1). – P. 59-69.
122. Impaired post-thymic development of regulatory CD4+25+ T cells contributes to diabetes pathogenesis in BB rats / P. Poussier, T. Ning, T. Murphy et al. // *J. Immunol.* – 2005. – N 174. – P. 4081-4089.
123. Impaired survival of peripheral T-cells, disrupted NK/NKT cell development, and liver failure in mice lacking Gimap5 / R.D. Schulteis, H. Chu, X. Dai et al. // *Blood.* – 2008. – N 112. – P. 4905-4914.
124. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory t cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes / J.M. Lavson, J. Tremble, H. Dayan et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – Vol. 154(3). – P. 353-359.
125. Interleukin-2 signaling is for CD-4 regulatory T-cell function / G. Furtado, M. Currotto de Lafaille, N. Kutchukhidze et al. // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196. – P. 851-857.
126. Interleukin-27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin-17 producing T-cells / M. Batten, J. Li, S. Yi et al. // *Nature Immunol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 1-8.
127. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis / R.A. Ajjan, P.F. Watson, R.S. McIntosh, A.P. Weetman // *Clin Exp Immunol.* – 1996. – Vol. 105(3). – P. 523-528.
128. Jaeger, B.N. Natural killer cell tolerance: control by self or self-control? / B.N. Jaeger, E. Vivier E. // *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – Vol. 4(3).

129. Kahaly, G.J. Autoimmune Polyglandular Syndromes / G.J. Kahaly // *Hot thyroidology*. – 2007. – N 1. – P. 1-6.
130. Kanel, R. Short-term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset redistribution / R. Kanel, P.J. Mills, J.E. Dimsdale // *Life Sci*. – 2001. – N 69. – P. 255-262.
131. Ke, S. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system / S. Ke, L. Bin // *Nature Reviews Immunology*. – 2003. – Vol. 3. – P. 900-911.
132. Kirkegaard, T. Lysosomal involvement in cell death and cancer / T. Kirkegaard, Jaattela M. // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – N 1793. – P. 746-754.
133. Komorowski, J. Interleukins in Graves disease / J. Komorowski // *Methods in molecular medicine*. – 2001. – N 1. – P. 251-261.
134. Korf, H. Pathogenesis of type 1 diabetes: immunological pathways / H. Korf, C. Gysemans, L. Overbergh // *International Diabetes*. – 2010. – Vol. 22. – P. 121-127.
135. LaBue, M. Thyrocytes isolated from autoimmune-diseased thyroids secrete soluble tumor necrosis factor-R1 that is related to their elevated protein kinase C activity / M. LaBue, K.K. Colburn, L.M. Green // *Thyroid*. – 2004. – Vol. 14, N 4. – P. 249-262.
136. Lam-Tse, W.K. Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity? / W.K. Lam-Tse, A. Lernmark, H.A. Drexhage // *Springer Semin Immunopathol*. – 2002. – Vol. 24(3). – P. 297-321.
137. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years / M.K. Andersen, V. Lundgren, J.A. Turunen et al. // *Diabetes Care*. – 2010. – Vol. 33(9). – P. 2062-2064.
138. Latent autoimmune diabetes in Tunisian adults (LADA): identification of autoimmune markers / C. Amrouche, K.H. Jamoussi, N. Trabelsi et al. // *Tunis Med*. – 2008. – Vol. 86(4). – P. 316-318.

139. Lawrence, M.C. Calcineurin/nuclear factor of activated T cells and MAPK signaling induce TNF-alpha gene expression in pancreatic islet endocrine cells / M.C. Lawrence, B. Naziruddin, M.F. Levy // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 14. – P. 1025-1036.
140. Li, H. The autoimmunity in Graves's disease / H. Li, T. Wang // *Front Biosci.* – 2013. – Vol. 18. – P. 782-787.
141. Li, Z. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells / Z. Li, W. Zhang, A. Sima // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2003. – Vol. 19. – P. 375-385.
142. Locksley, R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo // *Cell.* – 2001. – V. 104. – P. 487-501.
143. Maciejwska-Jeske, M. C-peptid and its role in the physiology and chosen endocrinopathies / M. Maciejwska-Jeske, A. Szczesna, B. Meczekalski // *Pol. Merkur Lekarski.* – 2011. – Vol. 31. – P. 75-79.
144. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes / S. Uno, A. Imagawa, K. Okita et al. // *Diabetologia.* – 2007. – V. 50, N 3. – P.596-601.
145. Mangan, P.R. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage / P.R. Mangan // *Nature.* – 2006. – Vol. 18. – P. 231-234.
146. Many, M.C. Two-step development of Hashmoto-Like thyroiditis in genetically autoimmune phone non-obese diabetic mice: effects of iodine-induced cell necrosis / M.C. Many, S. Maniratunga, I. Varis // *J. Endocrinol.* – 1995. – N 147. – P. 311-320.
147. Marchase, R.B. Lymphocytes from subjects with type diabetes are deficient in capacitative calcium entry: implications to immune function, cytokine production, and T cell subset representation / R.B. Marchase, P.Y. Chen, Z. Su // *Abstr. Book 4th Immunol. Diabet. Soc. Congr.* – November 12–15, 1999. – P. 82.

148. Massart, C. Peripheral blood and intrathyroidal T cell clones from patients with thyroid autoimmune diseases / C. Massart, G. Caroff, D. Maugendre // *Autoimmunity*. – 1999. – Vol. 31(3). – P. 163-174.
149. Matsuzawa, A. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling / A. Matsuzawa, H. Ichijo // *Antioxid. Redox Signal.* – 2005. – N 7. – P. 472-81.
150. Mi, Q.S. Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells / Q.S. Mi, D. Ly, P. Zucker // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53(5). – P. 1303-1310.
151. Miossec, P. Control and induction of autoimmunity by cytokine and anti-cytokine treatments / P. Miossec // *Mol. Autoimmunity*. – 2005. – Vol. 6. – P. 329-345.
152. Miyauchi, S. Increased levels of serum interleukin-18 in Graves disease / S. Miyauchi, B. Matsuura, M. Onji // *Thyroid*. – 2000. – Vol. 10, N 9. – P. 815-819.
153. Molecular role of TGF-beta, secreted from a new type of CD4+ suppressor T cell, NY4.2, in the prevention of autoimmune IDDM in NOD mice / H.S. Han, H.S. Jun, T. Utsugi, J.W. Yoon // *J Autoimmun.* – 1997. – Vol. 10(3). – P. 299-307.
154. Mori K. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: a key player or just a bystander? / K. Mori, K. Yoshida // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* – 2010. – Vol. 5. – P. 418-424.
155. Moss, M. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis / M. Moss, L. Skhlair-Tavron, R. Nudelman // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* – 2008. – Vol.4. – P. 300-309.
156. Naik, R.G. Latent autoimmune diabetes in adults / R.G. Naik, B.M. Brooks-Worrell, J.P. Palmer // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 94. – P. 4635-4644.

157. NK cell activity in patient with Graves disease and Hashimotos thyroiditis / B. Wenzel, A. Chow, R. Baur et al. // *Thyroid*. – 1998. – Vol. 8. – P. 1019-1022.
158. Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic interferon alpha-modulated mechanism / M. Stefan, E.M. Jacobson, A.K. Huber et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286(36). – P. 31168-31179.
159. Owens, T. Genetic models for CNS inflammation / T. Owens, H. Wekerie, J. Antel // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 161-166.
160. Padgett, L.E. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis / L.E. Padgett, K.A. Broniowska, P.A. Hansen, J.A. Corbett, H.M. Tse // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 1281. – P. 16-35.
161. Paolieri, F. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 beta in «destructive» organ-specific autoimmune disease (Hashimoto's thyroiditis) / F. Paolieri, C. Salmaso // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 22, N 876. – P. 221-228.
162. Phenekos, C. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimotos thyroiditis (Th1) and Graves disease (Th2) / C. Phenekos // *Neuroimmunomodulation*. – 2004. – Vol. 11. – P. 209-213.
163. Poncin, S. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro / S. Poncin, B. Lengele, I.M. Colin, A.-C. Gerard // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149(4) – P. 1534-1542.
164. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimotos thyroiditis / C. Giordano, G. Stassi, R. De Maria et al. // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – P. 960-963.
165. Prevention of autoimmune diabetes by linomide in nonobese diabetic (NOD) mice is associated with up-regulation of the TCR-mediated

- activation of p21(ras) / M.J. Rapoport, L. Weiss, A. Mor et al. // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 1245-4725.
166. Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients / M.N. Pharm, M.I. Hawa, C. Pflieger et al. // *Diabetologia* – 2011. – Vol. 54. – P. 1630-1638.
167. Production of IL-10 and IL-12 in CD40 and IL-4 activated mononuclear cells from patients with Graves' disease / M. Itoh, K. Uchimura, M. Makino et al. // *Cytokine.* – 2000. – Vol. 12, N 6. – P. 688-693.
168. Production of interleukin (IL-5) and IL-10 accompanies T helper cell type 1 (Th1) cytokine responses to a major thyroid self-antigen, thyroglobulin, in health and autoimmune thyroid disease / C.H. Nielsen, L. Hegedus, K. Rieneck et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2007. – Vol. 147, N 2. – P. 287-295.
169. Pugliese, A. Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics / A. Pugliese // *International Diabetes.* – 2010. – Vol. 22. – P. 101-111.
170. Rabinovitch, A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes / A. Rabinovitch // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – N 520. – P.159-193.
171. Rapoport, M.J. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes Up-regulated and delayed secretion of Th1cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus / M.J. Rapoport, A. Mor, P. Vardi // *Autoimmun.* – 1998. – Vol.11(6) – P.635-642.
172. Rapoport, M.J. Th/Th2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients/ M.J. Rapoport, T. Bistritzer, D. Aharoni // *Cytokine.* – 2005. – Vol. 30. – P.219-227.
173. Reciprocal developmental pathways for the generations of pathogenic effector Th17 and regulatory T-cells / E. Bettelli, J. Carrier, W. Gao et al. // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 235-238.
174. Regulatory T Cells and Human Disease / N. Cools, P. Ponsaerts, V.F. Van Tendeloo, N. Zwi // *Clin Dev Immunol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 543-557.

175. Regulatory T cells and immune tolerance / S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // *Cell*. – 2008. – Vol. 133, N 5. – P. 775-787.
176. Role of apoptosis in pathogenesis of thyroiditis / J. Stojanovic, D. Srefanovic, D. Vulovic et al. // *Med. Pregl.* – 2009. – Vol. 62(1-2). – P. 49-52.
177. Role of IL-12 receptor β 1 in regulation of T-cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis / G.X. Zhang, S. Yu, B. Gran et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 4485-4492.
178. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity / V. Dardalhon, T. Korn, V.K. Kuchroo, A.C. Anderson // *J. Autoimmun.* – 2008. – Vol. 31(3). – P. 252-256.
179. Roth, M. Transcription factors in asthma: are transcription factors a new target for asthma therapy / M. Roth, J. L. Black // *Curr. Drug. Targets.* – 2006. – N 7. – P. 589-595.
180. Rudensky, A.Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance / A.Y. Rudensky, M. Gavin, Y. Zheng // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N 2. – P. 253-256.
181. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance / S. Sakaguchi // *Cell*. – 2000. – Vol. 101. – P. 455-458.
182. Salmaso, C. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid disease / C. Salmaso, D. Olive, G. Pesce // *Autoimmunity*. – 2002. – N 35. – P. 159-167.
183. Santangelo, C. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in cytokine-induced human islet cell damage / C. Santangelo, P. Marchetti, L. Marselli // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44. – (Suppl. 1): A41.
184. Schulze-Koops H. Lymphopenia and autoimmune diseases / H. Schulze-Koops // *Arthritis Research and Therapy*. – 2004. – Vol. 6, N 4. – P. 178-180.

185. Seddon, B. Peripheral autoantigen induced regulatory T cells that prevent autoimmunity / B. Seddon, D. Mason // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189, N 5. – P. 877-882.
186. Seissler, J. Latent (slowly progressing) autoimmune diabetes in adults / J. Seissler // *Curr Diab Rep.* – 2008. – Vol. 8. – P. 94-100.
187. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF-alpha receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function / J.J. Dieze, A. Hermanz, S. Medina et al. // *Clin. Endocrinol.* – 2002. – Vol. 57. – P. 515-521.
188. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children / Y. Dogan, S. Akarsu, B. Ustundag et al. // *Mediators Inflamm.* – 2006. – Vol. 1. – P. 59206.
189. Sheng, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions / X. Sheng, C. Xuetao // *Cell. and Mol. Immunol.* – 2010. – Vol. 7. – P. 164-174.
190. Signaling transducer and activator of transcription (Stat)-6 dependent, but not Stat-4-dependent, immunity is required for the development of autoimmunity in Graves hyperthyroidism / K.J. Land, S.S. Moll, M.H. Kaplan et al. // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145. – P. 3724-3730.
191. Siminovitch, K.A. PTPN22 and autoimmune disease / K.A. Siminovitch // *Nat. Genet.* – 2004. – Vol. 36. – P. 1248-1249.
192. Simons, P.J. A functional and phenotypic study on immune accessory cells isolated from the thyroids of Wistar and autoimmune-prone BB-DP rats / P.J. Simons, F.G. Delemarre, H.A. Drexhage // *J. Autoimmun.* – 2000. – N 15. – P. 417-424.
193. Solerte, S.B. Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves disease and Hashimoto's thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate / S.B. Solerte // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – V. 152. – P. 703-712.

194. Stassi, G. Autoimmune thyroid disease new models of cell death in autoimmunity / G. Stassi, R. Mada // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2, N 3. – P. 195-204.
195. Storling, J. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt / J. Storling, I. Binzer, A.K. Andersson // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48(10). – P. 2039-2050.
196. Study of T-cell activation in type I diabetic patients and pre-type I diabetic subjects by cytometric analysis: antigen expression defect in vitro / C. Giordano, R. De Maria, M.S. Todaro et al. // *J. Clin. Immunol.* – 1993. – Vol.13. – P. 68-78.
197. Suppressor of cytokine signaling-1 overexpression protects pancreatic β -cells from CD8+ T-cell-mediated autoimmune destruction / M.W. Chong, Y. Chen, R. Darwiche et al. // *The Journal of Immunology.* – 2004. – Vol. 172. – P. 5714-5721.
198. Swain, M. Autoimmune thyroid disorders – an update / M. Swain, T. Swain, B.K. Mohanty // *Indian Jour. Of Clin. Biochemistry.* – 2005. – Vol. 20, N 1. – P. 9-17.
199. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice / Y. Oikawa, A. Shimada, A. Kasuga et al. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 171(11). – P. 5865-5875.
200. Tandon, N. Expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in autoimmune thyroid disease / N. Tandon, R.A. Metcalfe, D. Barnett // *Q. J. Med.* – 1994. – N 87. – P. 231-236.
201. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T-cells / M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins et al. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 179-189.
202. The autoimmunity-related GIMAP5 GTPase is a lysosome-associated protein / V. Wong, A.E. Saunders, A. Hutchings et al. // *Self Nonself.* – 2010. – N1. – P. 259-268.

203. The CD4(+) regulatory T-cells is decreased in adults with latent autoimmune diabetes / Z. Yang, Z. Zhou, G. Huang et al. // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2007. – Vol. 76. – P. 126-131.
204. The relationship between thyroid function, serum monokine induced by interferon gamma and soluble interleukin-2 receptor in thyroid autoimmune diseases / J. Jiskra, M. Antosova, Z. Limanova et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – N 156. – P. 211-216.
205. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease / G.F. Salinas, F. Braza, S. Brouard et al. // *Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 146, N 1. – P. 34-45.
206. Thyrocyte proliferation by cellular adhesion to infiltrating lymphocytes through the intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen-1 pathway in Graves disease / T. Arao, I. Morimoto, A. Karinuma et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85(1). – P. 382-389.
207. To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes / F.S. Wong, C. Hu, Y. Xiang, L. Wen // *Curr. Opin. Immunol.* – 2010. – Vol. 22(6). – P. 723-731.
208. Tomer, Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future / Y. Tomer. // *Thyroid.* – 2010. – Vol. 20(7). – P. 715-725.
209. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line / C. Huang, R. Nazarian, J. Lee et al. // *Int. J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 20. – P. 289.
210. Tuomi, T. LADA: is it distinct from type 1 diabetes? / T. Tuomi, M. Andersen, V. Lundgren // *International Diabetes.* – 2010. – Vol. 22. – P. 128-131.

211. Varanasi, V. Cytotoxic mechanisms employed by mouse T cells to destroy pancreatic β -cells / V. Varanasi, L. Avanesyan, D.M. Schumann, A.V. Chervonsky // *Diabetes*. – 2012. – Vol. 61(11). – P. 2862-2870.
212. Villa A. Genetically determined lymphopenia and autoimmune manifestations / A. Villa, V. Marrella, F. Rucci, L.D. Notarangelo // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, N 3. – P. 318-324.
213. Vujanovic, N.L. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity / N.L. Vujanovic // *Immunol Res.* – 2011. – Vol. 50. – P. 159-174.
214. Wajant, H. Tumor necrosis factor signaling / H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // *Cell. Death. Differ.* – 2003. – Vol. 10. – P. 45-65.
215. Watling, K.J. Receptor classification and signal transduction / K.J. Watling. – Natick. USA, 2006. – 416 p.
216. Weckmann, A.L. Cytokine inhibitors in autoimmune disease / A.L. Weckmann, J. Acocer-Varela // *Semin Arthritis Rheum.* – 1996. – Vol. 26(2). – P. 539-557.
217. Weetman, A.P. Cytokines and autoimmune thyroid disease / A.P. Weetman, R.A. Ajjan // *Hot thyroidology (www.hotthyroidology.com)*. – 2002. – N. 1.
218. Weetman, A.P. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease / A.P. Weetman // *Clin Endocrinol* – 2004. – Vol. 61 – P. 405–413.
219. Weetman, A.P. Concomitant autoimmune pathology in diseases of the thyroid / A.P. Weetman // *Thyroid International*. – 2005. – Vol. 1.
220. Wilkin, T.J. The primary lesion theory of autoimmunity: a speculative hypothesis / T.J. Wilkin // *Autoimmunity*. – 1990. – Vol. 7(4). – P.225-235.
221. Wormald, S. Inhibitors of cytokine signal transduction / S. Wormald, D. Hilton // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 821-824.
222. Yadav, U.C. Understanding the role of aldose reductase in ocular inflammation / U.C. Yadav, S.K. Srivastava, K.V. Ramana // *Curr Mol Med.* – 2010. – Vol. 10. – P. 540-549.

223. Yang, Z. Decrease of FOXP3 mRNA in CD4+ T cells in latent autoimmune diabetes in adult / Z. Yang, Z. Zhou, W.L Tang // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2006. – Vol. 86. – P. 2533-2536.