

УДК 616.441-008.61:57.089:575.174.015.3

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПЕРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ)

Саприна Т.В.¹, Прохоренко Т.С.¹, Рязанцева Н.В.^{1,2}, Ворожцова И.Н.¹, Мартынова С.Ю.¹, Дзюман А.Н.¹, Зима А.П.¹, Попов О.С.¹, Хлусов И.А.¹, Касоян К.Т.³, Шабалова И.П.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

³ Российская медицинская академия последипломного образования, г. Москва

РЕЗЮМЕ

В мировой и отечественной тиреологии практически отсутствуют исследования, результаты которых могли бы пролить свет на механизм взаимосвязи показателей системного иммунитета и органоспецифического аутоиммунного поражения железы при различных аутоиммунных тиреопатиях, детерминирующих разнообразные клинические паттерны их течения (возраст дебюта, риск развития и выраженность дистиреоза, риск рецидивирования или спонтанной ремиссии заболевания и т.д.).

Цель исследования – установить иммунологические и морфологические предикторы клинического течения и функциональных исходов болезни Грейвса (БГ).

Материал и методы. Обследовано 45 пациентов с БГ (14 мужчин и 31 женщина) в возрасте 18–55 лет (средний возраст – 47,0 (35,0–53,0)) года, удовлетворяющих следующим критериям: верифицированный диагноз БГ, проживание в Томской области и г. Томске не менее 10 лет, согласие пациента на исследование. Контрольная группа включала 30 человек (средний возраст – (45,3 ± 5,6) года) и была сопоставима по полу и возрасту с группами пациентов с БГ. Исследование включало: определение стандартного для БГ гормонального и серологического профиля (св. Т4, св. Т3, ТТГ, АТ-ТПО, АТ-рТТГ), культивирование мононуклеарных лейкоцитов в полной культуральной среде в течение 24 ч с последующим определением концентраций интерлейкинов (IL-2, IL-4, TNF-α) в супернатантах клеточных культур посредством твердофазного иммуноферментного анализа, определение количества клеток крови, несущих мембранно-связанные рецепторы к IL-2, IL-4, TNF-α методом проточной лазерной цитометрии на цитометре BD FACS Canto^{tmII} (США) с использованием меченых моноклональных антител, стандартное гистологическое исследование постоперационных образцов ткани щитовидной железы (ЩЖ) и иммуногистохимическую детекцию в образцах ткани ЩЖ рецепторов к IL-2, IL-4, TNF-α.

Результаты. Исходя из полученных результатов, можно выделить два клинико-иммунологических и морфологических кластера синдрома аутоиммунного гипертиреоза у больных с клиническим диагнозом БГ: первый включает формирование 1-го и 2-го гистологических вариантов БГ (минимально выраженная моноцитарная инфильтрация, отсутствие онкоцитарной трансформации эпителия) с определенными клиническими характеристиками (стойкий и выраженный характер гипертиреоза, большие размеры зоба, большой титр АТ-рТТГ и меньший АТ-ТПО, диффузный характер поражения), второй – представлен 3-м гистологическим вариантом с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия, выраженной моноцитарно/макрофагальной инфильтрацией с экспрессией TNF-R1 и клиническими паттернами (более старшая возрастная группа пациентов, меньшие размеры зоба, появление «псевдоузлов» при ультразвуковом исследовании, отражающих наличие лимфоидных фолликулов-инфильтратов, более мягкое течение тиреотоксикоза). Вероятно, что 2-й кластер представляет собой сочетание «классической БГ» с аутоиммунным тиреодитом, тем не менее комплексный анализ клинических и лабораторно-инструментальных показателей позволяет классифицировать таких больных как па-

✉ Саприна Татьяна Владимировна, тел.: 8 (3822) 53-15-87,
8-913-818-5826, факс: 8 (3822) 53-33-09; e-mail: tvsaprina@sibmail.com

циентов с БГ.

Заключение. Данный подход, объединяющий исследование показателей системного и локального органоспецифического аутоиммунного воспаления, является перспективным с точки зрения освещения отдельных звеньев иммунопатогенеза аутоиммунных тиреопатий, приближающим исследователей к разработке иммуоинтервенционных терапевтических технологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит, IL-2, IL-4, TNF- α , рецепторы цитокинов.

Введение

В настоящее время тиреоидная патология является наиболее частой в структуре эндокринных заболеваний. Вероятно, такая тенденция сохранится и в последующие годы, так как за последнее десятилетие отмечается неуклонное увеличение распространенности заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). В связи с научными достижениями последних лет становится возможным более детальное и глубокое изучение этиопатогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АЗЩЖ).

На сегодняшний день общепринятой концепцией развития АЗЩЖ является теория Volpe (1977), согласно которой в их патогенезе основная роль отводится первичным нарушениям иммунорегуляции – дефекту регуляторных Т-лимфоцитов, в результате чего нарушена элиминация «запрещенного» клона Т-клеток. Помимо дефекта в клеточном звене иммунитета в патогенезе АЗЩЖ немаловажную роль играет дисбаланс цитокинов с про- и противовоспалительными свойствами. Изучению особенностей развития данных заболеваний посвящено много работ, но они, к сожалению, противоречивы. Кроме того, имеющая на сегодняшний день модель патогенеза АЗЩЖ не объясняет клинического многообразия (гетерогенности) вариантов течения данных заболеваний, а также развития двух аутоиммунных заболеваний ЩЖ одновременно (overlap-синдромов).

В связи с этим было выполнено исследование цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* и гистологическое исследование ЩЖ (операционный материал) пациентов с болезнью Грейвса (БГ).

Цель исследования – установить иммунологические и морфологические предикторы клинического течения и функциональных исходов БГ.

Материал и методы

В группу пациентов с БГ было включено 45 человек (14 мужчин и 31 женщина) в возрасте 18–55 лет (средний возраст – 47,0 (35,0–53,0) года), удовлетворяющих следующим критериям: верифицированный

диагноз БГ, проживание в Томской области и г. Томске не менее 10 лет, согласие пациента на исследование.

Диагноз в каждом конкретном случае верифицировался согласно общепринятым критериям по следующему алгоритму: наличие характерных жалоб и анамнеза, выявление признаков заболевания при клиническом осмотре (в том числе пальпаторная характеристика ЩЖ, установление степени тяжести тиреотоксикоза), анализ медицинской документации, оценка ультразвукографических данных ЩЖ, оценка гормонального профиля (уровень тиреотропного гормона (ТТГ), свободных фракций тироксина и трийодтиронина), определение титра аутоантител к ткани ЩЖ: антитела к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО), антитела к рецептору тиреотропного гормона (АТ-рТТГ).

Критерии исключения из основной группы: беременность женщин или факт кормления грудью в период проведения обследования, наличие на момент скрининга и обследования острых форм и обострения хронических форм инфекционных заболеваний, наличие гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (атопическая болезнь – бронхиальная астма, atopический дерматит и т.д.), диагностированное и (или) леченное злокачественное заболевание в течение последних 5 лет, системные воспалительные заболевания (коллагенозы), нефрит любой этиологии, псориаз, инфицированность вирусами гепатитов В, С, D, ВИЧ, донорство одной (500 мл) или более единиц крови, значительная потеря крови в течение последних 2 нед, переливание крови в течение последних 8 нед; длительное пероральное или парентеральное применение кортикостероидов (более 7 дней лечения подряд) в течение 4 нед до скрининга, активное злоупотребление психоактивными веществами в анамнезе (включая алкоголь), установленная гемоглобинопатия или хроническая анемия, применение экспериментальных препаратов в течение 30 дней или 5 периодов полувыведения до скрининга, а также отказ от участия в исследовании (отказ от подписания информированного согласия). Исследование соответствовало требованиям локального этического комитета ГБОУ ВПО

СибГМУ Минздрава России (протокол № 946 от 16 февраля 2009 г.).

Материалом для данных исследований являлась сыворотка крови, для получения которой венозную кровь, взятую из локтевой вены утром до приема пищи, помещали в вакуумные пробирки BD Vacutainer с активатором свертывания кремнеземом (Becton Dickinson, США), центрифугировали пробирки 5 мин при 400g (1500 об/мин). В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию ТТГ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), АТ-ТПО и АТ-рТТГ (DRG, Германия).

Контрольная группа включала 30 человек (средний возраст – $(45,3 \pm 5,6)$ года) и была сопоставима по полу и возрасту с группами пациентов с БГ, не страдавших аутоиммунными заболеваниями, с учетом аналогичных критериев исключения из программы исследования.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077$ г/см³). Для получения супернатантов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде, стандартизируя их количество до $2,0 \cdot 10^6$ /мл с дальнейшей инкубацией клеточных суспензий в течение 24 ч.

Определение концентраций интерлейкинов (IL-2, IL-4, TNF- α) в супернатантах клеточных культур проводили с использованием твердофазного ИФА по инструкциям, предлагаемым производителем тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Учет результатов ИФА осуществляли с помощью фотометра для микропланшетов Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны $\lambda = 450$ нм.

Количество лимфоцитов крови, несущих мембранно-связанные рецепторы к IL-2, IL-4, TNF- α оценивали методом проточной лазерной цитометрии на цитометре BD FACS CantotmII (США) с использованием меченых моноклональных антител (МКАТ). Клетки отмывали фосфатным буфером (рН = 7,2) и окрашивали стандартными фикоэритрин-мечеными флуоресцирующими ($\lambda = 585$ нм) МКАТ к IL-2R (CD25), IL-4R (CD124) и TNF- α R1 (CD120) (Beckman Coulter, США).

Исследование продукции цитокинов *in vitro* и количества несущих комплементарные рецепторы лимфоцитов проводилось у пациентов с БГ до оперативного лечения. В основной группе 19 пациентам по различным показаниям (отсутствие ремиссии БГ на фоне тиреостатической терапии в течение 1,5 лет, диффузно-узловой токсический зоб) осуществлено оперативное лечение в объеме субтотальной и тотальной тиреоидэктомии. Были исследованы гистологиче-

ские препараты операционного материала ткани ЩЖ пациентов с БГ. Материал фиксировали в 10%-м забуференном (рН = 7,4) растворе формалина, дегидратировали в IsoPrep («Biovitrum», Россия), затем заливали в парафин Histomix (Biovitrum, Россия). На микро-томе Accu-Cut®SRM™200b (Sakura, Япония) изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм и монтировали на предметные стекла с L-полилизинным покрытием (Menzel, Германия).

Обзорную микроскопию осуществляли на микропрепаратах, окрашенных по стандартной методике гематоксилином Гарриса (Biovitrum, Россия) и эозином (Biovitrum, Россия) [1]. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа (Leica, Германия) при увеличении $\times 150$, $\times 200$, $\times 400$. Для иллюстрации были использованы программы, отображающие накопленные в процессе работы фотоматериалы (графический редактор «ImageJ»).

Анализ полученных результатов выполняли с помощью программы SPSS v. 11.5. Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде медианы *Me*, первого и третьего квартилей (Q_1 – Q_3). Для оценки достоверности различий показателей в сравниваемых группах использовали критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Исследование соответствовало требованиям локального этического комитета Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск), разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава Российской Федерации от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, подписали информированное согласие.

Результаты

При оценке гистологического строения ткани ЩЖ при БГ учитывали, что выделяют при данном заболевании 3 гистологических варианта (рис. 1–3) [2, 3].

Первый (классический) – пролиферативные явления со стороны тиреоидного эпителия, который образует сосочкообразные выросты в просвет фолликулов, отчего последние принимают звездчатый вид (рис. 1).

Второй – гиперплазия тиреоидного эпителия в виде появления мелких фолликулов с низким цилинд-

рическим эпителием с резорбцией коллоида или с полным его отсутствием, без признаков лимфоидной инфильтрации (рис. 2).

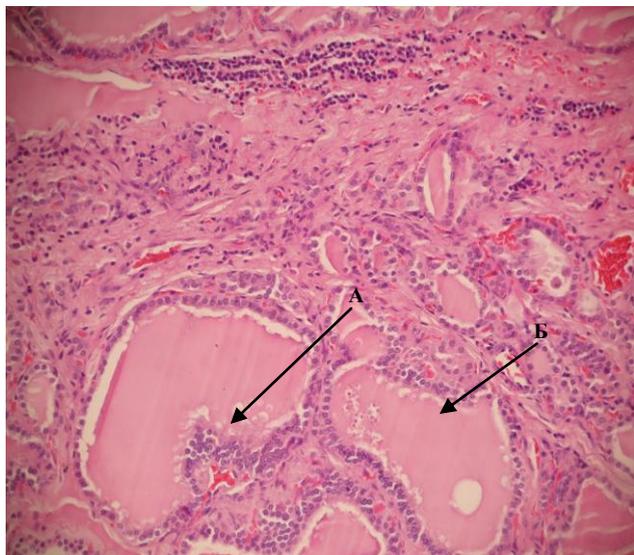


Рис. 1. Интрафолликулярный тип гиперплазии, пролиферация интрафолликулярного эпителия, образование многослойных «подушек Сандерсена», складки, симулирующие сосочки (А), коллоид жидкий, бледно-окрашивающийся, или совсем неокрашенный, пенистый по краям, резорбция коллоида (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 150

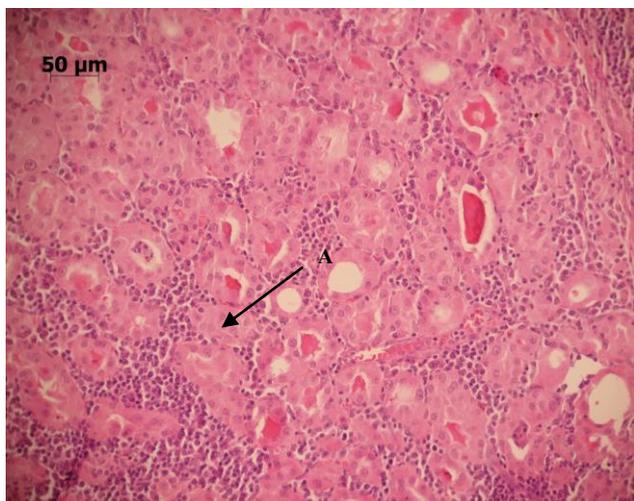
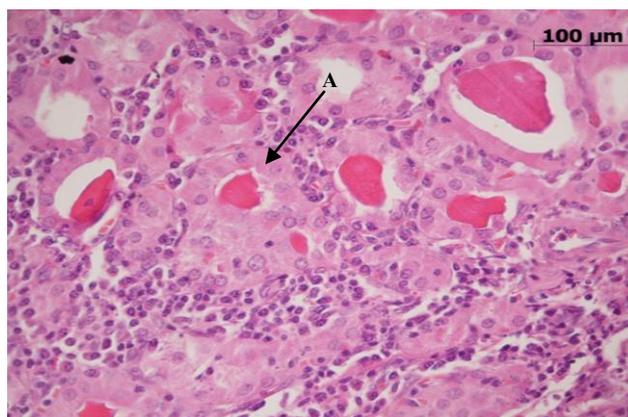


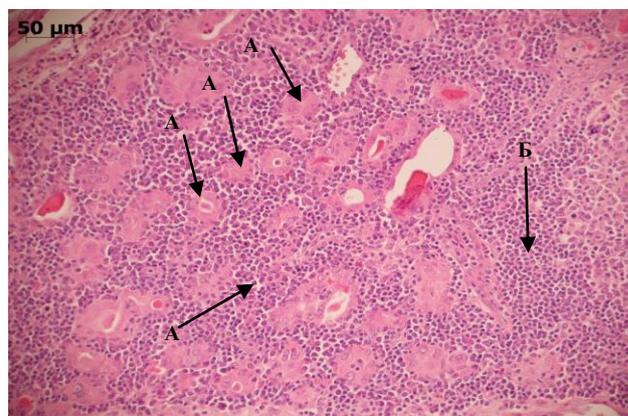
Рис. 2. Экстрафолликулярный тип гиперплазии, пролиферация экстрафолликулярного эпителия (А), увеличение количества и объема островков тироцитов между фолликулами, среди клеток происходит накопление коллоида, формирование мелких фолликулов, затем более крупных. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 150

Третий – с усиленной пролиферацией тиреоидного эпителия («сандерсеновские подушечки» или сосочкообразные выросты), эпителий кубический, лимфоидная инфильтрация сочетается с трансформацией тиреоидного эпителия в клетки Ашкенази (рис. 3).

В изучаемой выборке наиболее часто встречался второй гистологический вариант – 47,4% (9 человек). Первый (классический) вариант имел место в 26,3% случаев (5 пациентов), третий – в 10,5% случаев (2 больных). В 15,8% наблюдений (3 человека) у пациентов с БГ наблюдалось сочетание 2-го и 3-го гистологических вариантов. Больные с 3-м гистологическим вариантом строения ЩЖ и сочетанием 2-го и 3-го вариантов объединены в одну группу (5 пациентов) ввиду отсутствия достоверных межгрупповых различий в значениях изучаемых показателей ($p > 0,05$).



а



б

Рис. 3. Экстрафолликулярный тип гиперплазии с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия: а – фолликулы с клетками Ашкенази (круглые клетки с эозинофильной зернистой цитоплазмой и большим ядром) на фоне экстрафолликулярной гиперплазии эпителия у пациента с БГ (А). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400); б – мелкие фолликулы (А), тиреоидный эпителий фолликулов представлен преимущественно клетками Ашкенази-Гюртле (онкоциты) на фоне выраженной лимфоплазмочитарной инфильтрации (Б), практически отсутствует коллоид (пациент с БГ, гипертиреоз I). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

При сопоставлении клинко-инструментальных данных пациентов с БГ с вариантом гистологического строения ЩЖ отмечено преобладание классического варианта с формированием «псевдососочков» и «подушек Сандерсена» у больных с БГ с большим объемом

зоба. Так, средний объем ЩЖ у пациентов с первым гистологическим вариантом составил 55,3 (42,0–64,0) мл, со вторым вариантом – 32,0 (18,3–36,9) мл, с третьим и смешанным (2-й и 3-й) регистрировались самые низкие показатели объема ЩЖ – 24,0 (14,2–28,3) мл ($p < 0,05$). Таким образом, можно предположить, что пролиферативные процессы в ЩЖ при БГ имеют прогрессивный тип течения, т.е. начинаются с экстрафолликулярного типа пролиферации, при усилении пролиферативных сигналов появляется и интрафолликулярный тип пролиферации либо имеют место различные механизмы перестройки ткани вследствие воздействия различных иммунологических реакций в ткани ЩЖ при аутоиммунных тиреопатиях и при БГ, в частности.

Однонаправленные результаты были получены и при анализе гормональных показателей: уровень ТТГ был минимальным у пациентов с первым (классическим) вариантом гистологического строения ЩЖ – 0,01 (0,01–0,01) мМЕ/л в сравнении с 0,02 (0,01–0,04) мМЕ/л ($p = 0,02$) при 2-м варианте и 0,05 (0,03–0,06) при 3-м варианте, что также отражает связь степени пролиферативных процессов с выраженностью гипертиреоза при БГ.

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

кой медикаментозной и спонтанной ремиссии аутоиммунного тиреотоксикоза.

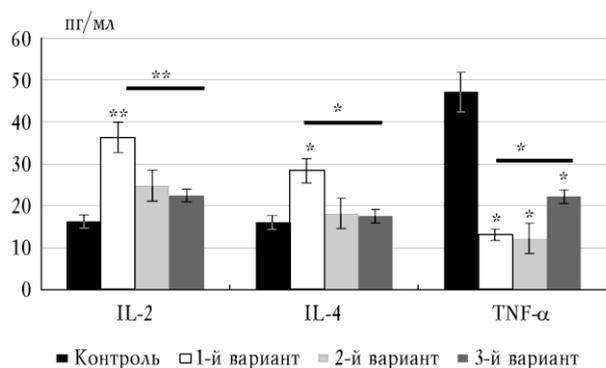
С другой стороны, было отмечено, что медиана возраста пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами существенно различается: пациенты с БГ и классическим для БГ гистологическим вариантом перестройки паренхимы статистически значимо моложе (26 (24–36) лет, $p < 0,05$), чем пациенты со 2-м гистологическим вариантом БГ – 49 (37–53) года, при БГ с 3-м гистологическим вариантом возраст пациентов был наибольшим – 53 (46–55) лет. Такая клиническая особенность согласуется с известным фактом преобладания «чистых» классических вариантов БГ среди лиц молодого возраста и накоплением заболеваемости АИТ с исходом в стойкий гипотиреоз с возрастом. Поэтому данные клинико-морфологические параллели могут быть крайне полезными для дальнейшего изучения специфических механизмов БГ и АИТ и разработки панели клинических, иммунологических и морфологических предикторов исхода указанных патологий.

Медиана стажа заболевания у пациентов с первым гистологическим вариантом БГ составила 2,0 (0,8–2,5) года, а со вторым – 4,0 (0,5–8,0) года и с 3-м – 4,0 (2,2–6,5) года, что косвенно отражает тяжесть заболевания и выраженность синдрома тиреотоксикоза, явившегося показанием для радикального хирургического лечения аутоиммунного тиреотоксикоза. Современные клинические рекомендации указывают на необходимость радикального излечения БГ (оперативное лечение или радиойодтерапия) после 1,5–2 лет тиреостатической терапии, если стойкая ремиссия заболевания не была достигнута. Обращает на себя внимание большой стаж БГ (максимально 10 лет) у некоторых пациентов, прежде чем они были подвергнуты оперативному лечению. Причину отклонения терапевтической стратегии от клинических рекомендаций в данном случае можно связать с мягким, «доброкачественным» течением аутоиммунного тиреотоксикоза в сочетании с высокими титрами АТ-ТПО, отсутствием выраженного зоба, а в ряде случаев и прогрессивного уменьшения объема ЩЖ на фоне проводимой медикаментозной терапии.

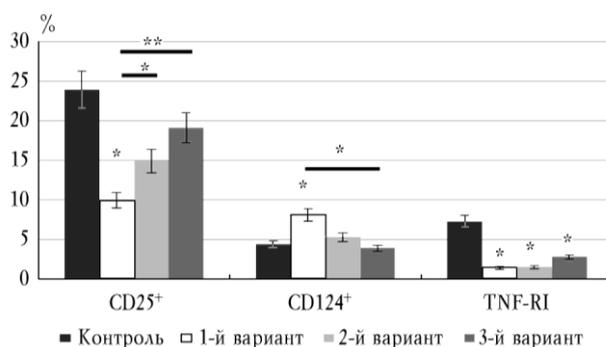
Полученные результаты демонстрируют, что подавляющее большинство больных с длительным, мягким течением БГ, не подвергнутых оперативному лечению в регламентированные сроки, – это пациенты с БГ, имеющие 2-й и 3-й гистологические варианты заболевания. Также предиктором более мягкого течения БГ, с небольшими размерами зоба и тиреотоксикозом легкой и средней степени тяжести явился мужской пол, так как среди пациентов со вторым гистологиче-

ским вариантом преобладали мужчины (62%; $\chi^2 = 5,7$; $p < 0,05$), в то время как пациентами с 1-м вариантом были только женщины (100%), что несколько противоречит установленной ранее закономерности более тяжелого течения тиреотоксикоза у мужчин, но хорошо согласуется с известной закономерностью о меньшей вероятности ремиссии БГ на фоне консервативной терапии у мужчин. Узловые образования фиксировались с одинаковой частотой при всех гистологических вариантах БГ ($p > 0,05$).

Анализ цитокинпродуцирующей активности культуры мононуклеарных лейкоцитов показал более высокий уровень продукции IL-2 и IL-4 при 1-м гистологическом варианте, что отражает взаимосвязь функциональной активности иммунцитов с клинико-морфологическими проявлениями заболевания (рис. 4). При этом другие исследователи фиксировали факт сопряженности гиперцитокинемии (IL-2, IL-4) с выраженностью гипертиреоза и объемом зоба при БГ [4]. Количество CD124-позитивных лимфоцитов крови превышало контрольные значения только при 1-м варианте БГ.



а



б

Рис. 4. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов крови (а) и содержание лимфоцитов крови, несущих комплементарные цитокинам рецепторы (б) у пациентов с различными гистологическими вариантами болезни Грейвса. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ в сравнении со значениями группы контроля, сравнения

Максимальная продукция TNF-α мононуклеарными лейкоцитами крови регистрировалась в подгруппе пациентов с БГ 3-м гистологическим вариантом, так же как и количество презентующих TNF-R1 лимфоцитов в крови было максимальным в подгруппе больных БГ с 3-м вариантом строения ткани, где имела место онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия (рис. 4) и «мягкое» клиническое течение аутоиммунного тиреотоксикоза.

Обсуждение

Изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов, как полагают, играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Срыв аутоотолерантности к ткани ЩЖ, как правило после инфекции, генерирует комплекс отклоненных от нормы иммунных реакций с вовлечением множества цитокинов. Тиреоциты контактируют с антигенпредставляющими клетками, которые, в свою очередь, коммитируют Th1- и Th2-клоны лимфоцитов в условиях существующего дефекта Т-регуляторных клеток. Результатом этих реакций является формирование интратиреоидного лимфоцитарно-моноцитарного инфильтрата, активация В-лимфоцитов и наработка аутоантител к клеточным структурам фолликулярного эпителия ЩЖ. В результате развивается либо деструкция, либо стимуляция ЩЖ, в зависимости от Th1/Th2-баланса иммунного ответа.

За последнее десятилетие многие исследователи доказали, что способность распознавания аутоантигенов субпопуляциями Т-клеток имеет различную вариабельность, а в патогенез АИТ и БГ вовлечены Th1- и Th2-типы иммунного ответа. В то же время при АИТ активируется преимущественно Th1-тип иммунного ответа (характеризующийся преобладанием интратиреоидной продукции IL-2, IFN-γ, и TNF-α, при относительном дефиците IL-4 или IL-10, вследствие чего наблюдается массивный апоптоз тиреоцитов [5]. В противоположность этому при БГ среди клеток инфильтрата щитовидной железы преобладают лимфоциты Th2-типа, а тиреоциты не подвергаются апоптозу [6]. Известно, что Th2-тип иммунного ответа характеризуется относительным дефицитом IL-2, TNF-α, IFN-γ и преобладанием продукции клетками IL-4, IL-5

и IL-10, стимулирующих синтез аутоантител В-лимфоцитами [5].

Ранее в работах нашей группы показано [7], что продукция IL-2 и IL-4 нестимулированными мононуклеарными лейкоцитами, выделенными из периферической крови пациентов с БГ как в фазе тиреотоксикоза,

так и в фазе медикаментозного эутиреоза, не отличалась от аналогичных параметров в контрольной группе здоровых добровольцев. Только в группе больных с БГ с манифестным тиреотоксикозом незначительно увеличивалась концентрация ИЛ-2 в супернатантах клеточных культур. С другой стороны, количество лимфоцитов с комплементарными рецепторами к ИЛ-2, ИЛ-4 изменялось при БГ следующим образом: количество лимфоцитов, несущих молекулу CD25, уменьшалось у пациентов с БГ, независимо от функционального состояния щитовидной железы, а количество CD124⁺-лимфоцитов статистически значимо увеличивалось [7].

Результатом проведенного блока исследований было установление факта сочетания более высокой продукции ИЛ-2 и ИЛ-4 мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с классическим гистологическим вариантом перестройки паренхимы при БГ, который ассоциирован с яркой клинической картиной аутоиммунного тиреотоксикоза: молодой возраст, большие размеры зоба, максимальная продукция тиреоидных гормонов и выраженность продуктивной фазы аутоиммунного воспаления с преимущественной выработкой специфических антител к рТТГ и относительно небольшим титром АТ-ТПО. Продемонстрированная ранее тенденция к изменению количества лимфоцитов крови, несущих CD25 и CD124, в общей группе пациентов с БГ [7], оказалась более выраженной при сопоставлении указанных иммунологических параметров с гистологическими характеристиками строения ЩЖ. В группе пациентов с «классическим» гистологическим вариантом регистрировалось наименьшее количество лимфоцитов, несущих CD25 и наибольшее число CD124-позитивных клеток, что указывает на Th2-поляризацию иммунного ответа только при «классических» вариантах БГ.

Опираясь на данные литературы, указывающие на увеличение при БГ концентрации растворимого рецептора к ИЛ-2 как в сыворотке крови, так и в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов [8], можно предположить, что в данном случае имеет место повышенный шеддинг рецепторов к ИЛ-2 с мембраны лимфоцитов. Однако точные механизмы этого процесса не раскрыты. Поскольку взаимодействие ИЛ-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 рассматривается в качестве фактора, способствующего большей сохранности тиреоцитов при БГ, чем при АИТ.

Роль в иммунопатогенезе БГ и АИТ продуцируемого интраклеточными лимфоцитами ИЛ-4 многогранна. 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, как при тиреотоксикозе, так и в фазе эутиреоза, в крови определялся повышенный уровень антител к ТПО и рецептору ТТГ [7]. Это означает, что при данном заболевании в ЩЖ сочетаются процессы активации гормон-продуцирующей функции фолликулярных клеток за счет стимулирующего действия аутоантител к рТТГ и гибели тиреоцитов, вызванной анти-ТПО-зависимой цитотоксичностью [9]. 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 [10].

По результатам наших исследований, с «классическим» гистологическим вариантом и выраженной клинической манифестацией БГ были ассоциированы самые высокие показатели продукции ИЛ-4 и количества лимфоцитов, презентующих комплементарные ИЛ-4 рецепторы. В связи с этим открытым и перспективным является изучение вопроса о возможном дозозависимом эффекте ИЛ-4 на видоспецифичность продуцируемых В-лимфоцитами антитиреоидных антител (АТ-рТТГ, АТ-ТПО) при аутоиммунных тиреопатиях (АИТП). Вместе с тем, существуют доказательства прямого и косвенного эффекта ИЛ-4 на функцию тиреоцитов. В экспериментальных исследованиях была показана способность ИЛ-4 нивелировать вызванную другими цитокинами (ИЛ-1 β и IFN- γ) альтерацию паренхимы ЩЖ и угнетение функциональной активности тиреоцитов. Также доказано, что ИЛ-4 уменьшает депрессивные эффекты на функцию ЩЖ, вызванные ИЛ-10, но не TGF- β [11, 12].

Интересными являются изменения, касающиеся продукции TNF- α мононуклеарными лейкоцитами и количества лимфоцитов, презентующих комплементарные TNF- α рецепторы. В исследовании, проведенном нами ранее [7], в группе пациентов с БГ регистрировались следующие сдвиги в системе TNF- α и его рецепторов: отмечалось достоверное снижение продукции TNF- α мононуклеарными лейкоцитами по сравнению с контрольной группой, уменьшалось количество TNF-R1-презентирующих лимфоцитов. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, отмечающих снижение TNF- α при БГ [13].

В ходе данного этапа исследования была отмечена следующая закономерность: среди пациентов с БГ более высокие показатели TNF- α -продуцирующей способности мононуклеарных лейкоцитов и количество CD120-позитивных лимфоцитов регистрировали у больных с 3-м гистологическим типом перестройки паренхимы, минимальные – у пациентов с 1-м гистологическим типом. Данное иммунологическое отклонение ассоциировалось с более «мягким» доброкачественным течением аутоиммунного гипертиреоза, с преобладанием титра АТ-ТПО, нежели титра АТ-рТТГ, а также со сравнительно меньшим объемом железы, чем у пациентов с 1-м гистологическим вариантом. Согласно некоторым исследованиям, уровень апоптоза лимфоцитов при БГ не повышается, в отличие от АИТ, что может свидетельствовать о пролиферативной направленности патологических процессов при БГ на фоне выраженного аутоиммунного воспаления, реализуемого через механизмы аутоантителопродукции [9]. Данный факт можно рассматривать и как следствие уменьшения количества TNF-R1-презентирующих лимфоцитов, что и было обнаружено нами в ходе ранее проведенного исследования [7].

Известно, что TNF- α играет важную роль в развитии АИТ, в частности, БГ. TNF- α , являясь провоспалительным цитокином, активирует лимфоциты, регулирует их апоптоз и процессы межклеточной коммуникации иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления. При БГ TNF- α усиливает абберантную экспрессию молекул адгезии и HLA II класса на поверхности тиреоцитов, что может способствовать запуску аутоиммунных процессов в ЩЖ [14]. Показано, что продукция TNF- α лимфоцитами крови пациентов с БГ была близка к нормальной и возростала на фоне терапии радиоактивным йодом, не была увеличена сывороточная концентрация TNF- α [15]. В некоторых исследованиях обнаружено, что уровни мРНК TNF- α в ткани ЩЖ у больных с БГ были ниже, чем у пациентов с АИТ. По мнению исследователей, дефицит интратиреоидной продукции TNF- α у пациентов с рецидивом БГ связан с дефицитом продукции TNF- α клонами Т-лимфоцитов, изолированных от ЩЖ [16–18].

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования дополнили существующие данные о преобладании эффектов TNF- α при интратиреоидном воспалении, сочетающем признаки БГ и АИТ (наличие повышенных концентраций АТ-рТТГ и к ТПО), нежели при «чистом» варианте БГ. Выявили факт «смягчения» клинического течения БГ при активизации ис-

ходно супрессированной системы TNF- α и его рецепторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, № НШ-4184.2014.7.

Литература

1. *Микроскопическая техника: руководство* / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
2. *Пругло М.Ю.* Критерии весовой и морфологической оценки щитовидной железы в условиях нормы и патологии / под ред. И. Секине, Т.М. Вилера, С.И. Иржанова. Алматы, 2000. 117 с.
3. *Хмельницкий О.К.* Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: Сотис, 2002.
4. *Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В. и др.* Апоптоз лимфоцитов крови у больных аутоиммунными тиреопатиями // Медицинская иммунология. 2008. Т. 10, № 2–3. С. 187–192.
5. *McIver B., Morris J.C.* The pathogenesis of Graves' disease // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1998. № 27. P. 73–89.
6. *Stassi G., Zeuner A., Di Liberto D., Todaro M., Ricci-Vitiani L., De Maria R.* Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis // *J. Clin. Immunol.* 2001. № 21. P. 19–23.
7. *Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Резцова В.М., Зима А.П. и др.* Особенности продукции и рецепции цитокинов Th1/Th2-профиля при болезни Грейвса // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2012. Т. 8, № 2. С. 43–49.
8. *Jiskra J., Antosova M., Limanova Z., Telicka Z., Lacinova Z.* The relationship between thyroid function, serum monokine induced by interferon gamma and soluble interleukin-2 receptor in thyroid autoimmune diseases // *Clinical and Experimental Immunology.* 2009. V. 156. P. 211–216.
9. *Дрометр Д.А.* Иммунологические аспекты формирования патологических состояний щитовидной железы, сопровождающихся синдромом тиреотоксикоза (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Екатеринбург, 2009. 25 с.
10. *Кандор В.И., Крайнева С.И., Крюкова И.В., Мкртумова Н.А.* К механизма пролиферации и гибели тиреоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы // *Вестник РАМН.* 2006. № 9–10. С. 56–61.
11. *Poncin S., Lengele B., Colin I.M., Gerard A.C.* 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* // *Endocrinology.* 2008. Apr; 149 (4). P. 1534–1542.
12. *Bossowski A., Harasymczuk J., Moniuszko A., Bossowska A., Hilczer M., Ratomski K.* Bossowski et al. Cytometric evaluation of intracellular IFN- γ and IL-4 levels in thyroid follicular cells from patients with autoimmune thyroid diseases // *Thyroid Research.* 2011. № 4. P. 13.
13. *Dorshkind K., Horseman N.D.* The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency // *Endocrine Reviews.* 2000. V. 21. P. 292–312.

14. *Vujanovic N.L.* Role of TNF superfamily ligands in innate immunity // *Immunol Res.* 2011. Aug; 50 (2–3). P. 159–174.
15. *Jones B., Kwok C., Kung A.* Effect of radio-active iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increase in IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-alpha, with longer term increase in IFN-gamma production // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. P. 4106–4110.
16. *Aust G., Heuer M., Laue S., Lehmann I., Hofmann A., Heldin N-E.* Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines // *Clinical and Experimental Immunology.* 1996. V. 105. P. 148–154.
17. *Paschke R., Kist A., Janicke R., Eck T., Velu T., Usadel K.H.* Lack of intrathyroidal tumor necrosis factor alpha in Graves' disease // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1993. V. 76. P. 97–102.
18. *Salvi M., Pedrazzoni M., Girasole G., Giuliani N., Minelli R., Walli J.R., Roti E.* Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking // *European Journal of Endocrinology.* 2000. V. 143. P. 197–202.

Поступила в редакцию 06.10.2014 г.

Утверждена к печати 04.02.2015 г.

Саприна Татьяна Владимировна (✉) – канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии и диабетологии СибГМУ (г. Томск).

Прохоренко Татьяна Сергеевна – ассистент кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Рязанцева Наталья Владимировна – д-р мед наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск); профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

Ворожцова Ирина Николаевна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой эндокринологии и диабетологии СибГМУ (г. Томск).

Мартынова Светлана Юрьевна – врач-эндокринолог клиники эндокринологии СибГМУ (г. Томск).

Дзюман Анна Николаевна – канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, руководитель научно-образовательного центра инновационных технологий в морфологии СибГМУ (г. Томск).

Зима Анастасия Павловна – д-р мед. наук, профессор кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Попов Олег Сергеевич – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры общей хирургии СибГМУ (г. Томск).

Хлусов Игорь Альбертович – д-р мед наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Касоян Карине Тимуровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики Российской мед. академии последипломного образования (г. Москва).

Шабалова Ирина Петровна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики Российской мед. академии последипломного образования (г. Москва).

✉ **Саприна Татьяна Владимировна**, тел.: 8 (3822) 53-15-87, 8-913-818-5826, факс 8 (3822) 53-33-09; e-mail: tvsaprina@sibmail.com

IMMUNOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL PREDICTORS OF CLINICAL HETEROGENEITY OF PATIENTS WITH GRAVES' DISEASE (BASED ON RESEARCH OF THE THYROID GLAND OPERATIONAL MATERIAL)

Saprina T.V.¹, Prokhorenko T.S.¹, Ryazantseva N.V.^{1,2}, Vorozhtsova I.N.¹, Martynova S.Yu.¹, Dzyuman A.N.¹, Zima A.P.¹, Popov O.S.¹, Khlusov I.A.¹, Kasoyan K.T.³, Shabalova I.P.³

¹ *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

² *Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation*

³ *Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT

Very little research is devoted to the study of communication systemic immunological changes and local immunological changes in the tissue of the thyroid in autoimmune thyropathies. The goal of the research was to establish immunologic and morphologic predictors of clinical course and functional outcomes of Graves's disease (GD).

Material and methods. We examined 45 patients with GD (14 men and 31 women) aged 18–55 years (47.0 (35.0–53.0)) years, matching the following criteria: a verified diagnosis GD, accommodation in Tomsk oblast and the Tomsk not less than 10 years, the patient's consent for the study. The control group included 30 people, with an average age of (45.3 ± 5.6) years and was comparable by age and sex with GD patients. The study included: definition of the standard for GD hormonal and serological profile (free T₄, free T₃, and TSH, antibodies to TPO, antibodies to the TSH receptor), the cultivation of mononuclear leukocytes in complete culture medium within 24 hours with subsequent determination of interleukins concentrations (IL-2, IL-4, TNF-alpha) in culture medium using enzyme-linked immunosorbent assay, determination of the number of blood cells carrying membrane-bound receptors to IL-2, IL-4, TNF-R1 by flow laser cytometry on cytometer BD FACS Canto™ (USA) using labeled monoclonal antibody, the standard postoperative histological examination of thyroid gland tissue samples and immunohistochemical detection in samples of thyroid tissue receptors to IL-2, IL-4, TNF-alpha.

Results. On the basis of the received results it is possible to allocate 2 clinical-immunologic and morphologic cluster of autoimmune hyperthyroidism syndrome in patients with clinical diagnosis of GD. The first includes the formation of 1 and 2 histological options GD (minimally expressed monocytes infiltration, lack of oncocyctic transformation of thyroid epithelium), with some clinical characteristics (persistent and pronounced hyperthyroidism, the large size of goiter, higher titer of receptor TSH-antibody and smaller TPO-antibody, diffuse nature of the lesion), and the second – is represented by 3d histological option with oncocyctic restructuring of follicular epithelium, expressed the monocyte/macrophage infiltration with the TNF-RI expression and clinical patterns, including: the older age group of patients, the smaller size of goiter, the emergence of “pseudo nodes” ultrasound, reflecting the presence of lymphoid follicles-infiltrates, more lenient for hyperthyroidism. Probably, that the 2nd cluster is a combination of “classical GD” with autoimmune thyroiditis, however, a set of clinical and laboratory-instrumental signs led to the fact that these patients were in the group of GD patients.

Conclusion. This approach (combining study of indicators of systemic and local tissue-specific autoimmune inflammation) is a promising from the point of view of separate parts coverage in the autoimmune thyroids diseases pathogenesis, approximating researchers to develop immune based therapeutic technologies.

KEY WORDS: Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, IL-2, IL-4, TNF-α, cytokine receptors.

Bulletin of Siberian Medicine, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 81–91

References

1. *The microscopic technique: Manual*. Ed. D.S. Sarkisov, J.L. Perov. Moscow, Medicine Publ., 1996. 544 p. (in Russian).
2. Pruglo M. *Criteria weight and morphological evaluation of the thyroid gland in normal and pathological conditions*. Ed. I. Sekine, T.M. Wheeler, S.I. Irzhanova. Almaaty, 2000. 117 p. (in Russian).
3. Khmel'nitsky D.C. *Cytological and histological diagnosis of diseases of the thyroid gland*. St. Petersburg, Sothis Publ., 2002 (in Russian).
4. Urazova O.I., Kravets E.B., Novitsky V.V., Rogaleva A.V. Apoptosis and other blood lymphocytes in patients with autoimmune tireopatiyami. *Medicinskaya immunologiya – Russian Journal of Medical Immunology*, 2008, vol. 10, no. 2–3, pp. 187–192 (in Russian).
5. McIver B., Morris J.C. The pathogenesis of Graves' disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1998, vol. 27, pp. 73–89.
6. Stassi G., Zeuner A., Di Liberto D., Todaro M., Ricci-Vitiani L., De Maria R. Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Immunol.*, 2001, no. 21, pp. 19–23.
7. Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Reztsova V.M., Zima A.P. Features and other cytokine production and reception Th1/Th2- profile in Graves' disease. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya – Clinical and Experimental Thyrologists*, 2012, vol. 8, no. 2, pp. 43–49 (in Russian).
8. Jiskra J., Antosova M., Limanova Z., Telicka Z., Lacinova Z. The relationship between thyroid function, serum monokine induced by interferon gamma and soluble interleukin-2 receptor in thyroid autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, vol. 156, pp. 211–216.
9. Drometr D.A. *Immunological aspects of the formation of pathological conditions of the thyroid gland, accompanied by the syndrome of hyperthyroidism (an experimental study)*. Author. Dissertation PhD. Ekaterinburg, 2009. 25 p. (in Russian).
10. Kandror V.I., Krayneva S.I., Kryukov I.V., Mkrtumova N.A. The mechanisms of cell proliferation and death of thyroid

- cells in autoimmune diseases of the thyroid gland. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Bulletin of the Russian Academy of Medical Science*. 2006. № 9–10. P. 56–61 (in Russian).
11. Poncin S., Lengele B., Colin I.M., Gerard A.C. 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*. *Endocrinology*, 2008, Apr; 149 (4), pp. 1534–1542.
 12. Bossowski A., Harasymczuk J., Moniuszko A., Bossowska A., Hilczer M., Ratomski K. Bossowski et al. Cytometric evaluation of intracellular IFN-g and IL-4 levels in thyroid follicular cells from patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Research*, 2011, no. 4, pp. 13.
 13. Dorshkind K., Horseman N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews*, 2000, vol. 21, pp. 292–312.
 14. Vujanovic N.L. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol. Res.*, 2011, Aug; 50 (2–3), pp. 159–174.
 15. Jones B., Kwok C., Kung A. Effect of radio-active iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increase in IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-alpha, with longer term increase in IFN-gamma production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, vol. 84, pp. 4106–4110.
 16. Aust G., Heuer M., Laue S., Lehmann I., Hofmann A., Heldin N-E. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. *Clinical and Experimental Immunology*, 1996, vol. 105, pp. 148–154.
 17. Paschke R., Kist A., Janicke R., Eck T., Velu T., Usadel K.H. Lack of intrathyroidal tumor necrosis factor alpha in Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1993, vol. 76, pp. 97–102.
 18. Salvi M., Pedrazzoni M., Girasole G., Giuliani N., Minelli R., Walli J.R., Roti E. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves'disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. *European Journal of Endocrinology*, 2000, vol. 143, pp. 197–202.

Saprina Tatiana V. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Prokhorenko Tatiana S., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ryazantseva Natalia V., Siberian State Medical University, Tomsk; Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Vorozhova Irina N., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Martynova Svetlana Yu., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Dzyuman Anna N., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Zima Anastasiya P., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Popov Oleg S., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Khlusov Igor A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kasoyan Karine T., Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation.

Shabalova Irina P., Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation.

✉ **Saprina Tatiana V.**, Ph.: +7 (3822) 53-15-87, +7-913-818-5826, Fax +7 (3822) 53-33-09; e-mail: tvsaprina@sibmail.com