

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

профессор, академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ

Новицкий Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Степовая Елена Алексеевна

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Солонский Анатолий Владимирович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Новосибирск)

Защита состоится « 28 » ноября 2013 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д.2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Автореферат разослан « ____ » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Кандрор 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 [Кандрор 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 TNF α (цитокин, мембраносвязанная и растворимая формы рецепторов) в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных сахарным диабетом 1 типа и 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, TNF α 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 микроангиопатию; 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).

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.

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода, анализе литературы. Автором проведены исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

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.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу настоящей работы положены 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). 135 пациентов (63 мужчины и 72 женщины, средний возраст – $41,1 \pm 1,0$ лет) страдали сахарным диабетом, 74 человека (33 мужчины и 41 женщина, средний возраст – $42,2 \pm 1,4$ лет) – тиреопатиями аутоиммунного генеза. 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. В контрольную группу были включены 30 практически здоровых добровольцев (14 мужчин и 16 женщин, средний возраст – $45,3 \pm 5,6$ лет) с верифицированным отсутствием нарушений углеводного обмена и заболеваний щитовидной железы. Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены острые формы и обострение хронических форм заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза, аллергические заболевания, переливание крови в течение последних 8-ми недель, вакцинация менее чем за 2 месяца до момента обследования, длительное пероральное или парентеральное применение кортикостероидов в течение 4 недель до обследования, употребление психоактивных веществ.

Среди больных сахарным диабетом (СД) были выделены группы пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза, включая 37 лиц (24 мужчины и 13 женщин, средний возраст – $30,5 \pm 1,2$ лет) с сахарным диабетом 1 типа (СД1), 31 (12 мужчин и 19 женщин, средний возраст – $41,4 \pm 2,1$ лет) – с латентным аутоиммунным диабетом взрослых (LADA). Группой сравнения для обследованных пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза служили 67 человек (40 женщин и 27 мужчин, средний возраст – $46,8 \pm 1,1$ лет) с диагнозом сахарный диабет 2 типа (СД2). Диагноз СД во всех клинических группах был поставлен согласно диагностическим критериям сахарного диабета и других нарушений углеводного обмена (ВОЗ, 1999 г.). Группа больных LADA была сформирована путем скринингового обследования пациентов с первичным диагнозом СД2 на основании следующих клинико-лабораторных критериев: острая манифестация заболевания в возрасте от 30 до 50 лет без развития кетоацидоза; отсутствие потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижение метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес от начала заболевания; индекс массы тела – менее 25 кг/м^2 , отсутствие признаков метаболического синдрома; появление клинических признаков вторичной резистентности к препаратам сульфонилмочевины в течение первых 3-5 лет терапии; наличие аутоиммунных заболеваний у пациента или его родственников первой линии; наличие диагностически значимых концентраций в крови одного или

нескольких типов органоспецифических антител к поджелудочной железе. Все группы пациентов с СД были сопоставимы по уровню гликированного гемоглобина.

Каждая группа пациентов с СД была разделена на подгруппы в зависимости от наличия микроангиопатий (диабетическая ретинопатия, нефропатия). 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 диабетической ретинопатии 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 (подобно СД2) развитие микроангиопатий обнаруживалось в среднем после 4-го года заболевания и было ассоциировано с резким снижением концентрации С-пептида в крови (табл. 1).

Таблица 1

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

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

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

Больные аутоиммунными тиреопатиями 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 – $44,9 \pm 1,2$ лет) с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), вторую группу составили 45 пациентов (21 мужчина, 24 женщины, средний возраст – $42,9 \pm 1,5$ лет) с болезнью Грейвса (БГ). Группа больных АИТ в зависимости от функционального состояния щитовидной железы была разделена на подгруппы пациентов в фазе эутиреоза (19 пациентов, из них 9 мужчин, 10 женщин, средний возраст – $42,3 \pm 1,3$ лет) и в фазе гипотиреоза (10 пациентов, из них 3 мужчины, 7 женщин, средний возраст – $44,7 \pm 1,6$ лет). В группе пациентов с БГ были выделены 2 подгруппы: пациенты в фазе эутиреоза (14 человек, из них 4 мужчины и 10 женщин, средний возраст – $38,6 \pm 1,3$ лет) и в фазе тиреотоксикоза (31 человек, из них 17 мужчин, 14 женщин; средний возраст – $43,8 \pm 1,2$ лет). 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 и БГ устанавливали на основании характерных клинико-лабораторных признаков, согласно общепринятым критериям («Эндокринология. Национальное руководство», 2012).

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

Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 2.

Материалом для данных исследований являлась венозная кровь, стабилизированная этилендиаминтетраацетатом, взятая утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 10 мл. В случае определения концентрации аутоантител использовали сыворотку крови, для получения которой венозную кровь набирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания кремнеземом, центрифугировали пробирки 5 мин при 400 g (1500 об/мин).

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

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

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

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

Таблица 2

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 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови концентрации 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

пероксидазе и к рецептору тиреотропного гормона («DRG», Германия).

Оценку полученных данных проводили методами статистического анализа. 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].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время известно, что механизмы развития аутоиммунного повреждения поджелудочной и щитовидной желез сопряжены с активацией клеточного и гуморального звеньев иммунитета в результате срыва толерантности к собственным антигенным структурам [Atkinson M., 2005; Cools N. et al., 2007; Репина Е.А., 2010; Buckner J.H., 2010]. Однако, несмотря на многочисленные исследования в этой области, на сегодняшний день отсутствуют единые представления о факторах, способствующих поддержанию аутореактивных иммунных процессов в эндокринных железах. Поскольку непосредственными участниками воспаления, протекающего в органе-мишени, являются лимфоциты, в проведенном нами исследовании был рассмотрен их субпопуляционный состав в крови у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями.

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

Основными результатами явились изменения количества Т- и NK-лимфоцитов. Относительное содержание Т-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров составило 69,70 (65,94-70,90) %. Количество CD3⁺-лимфоцитов у больных СД1 [73,69 (70,86-76,18) %] и у пациентов с LADA [75,81 (73,13-79,31) %] достоверно превышало таковое у здоровых лиц ($p=0,04$ и $p=0,008$, соответственно). Содержание CD16⁺CD56^{low}-клеток у пациентов с СД1 [13,71 (10,37-17,07) %] и с LADA [11,60 (9,10-14,36) %] оказалось значимо ниже их числа у здоровых доноров [17,24 (16,18-19,88) %, $p=0,03$ и $p=0,007$, соответственно]. При этом у пациентов с

СД2 (группа сравнения) подобные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, относительно значений в контроле, обнаружены не были, что подчеркивает связь выявленных отклонений клеточного состава с развитием сахарного диабета аутоиммунного генеза.

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

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

В качестве показателя вовлеченности в механизмы развития заболевания гуморального компонента иммунной системы нами была оценена концентрация в сыворотке крови органоспецифических антител. При этом было показано, что концентрация антител к поверхностному антигену β -клетки, декарбоксилазе глутаминовой кислоты и инсулину в сыворотке крови у больных аутоиммунным сахарным диабетом не зависела от наличия микроангиопатий ($p>0,05$). Сравнительный анализ концентрации аутоантител 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 достоверно выше ($p=0,02$ и $p=0,03$, соответственно) такового у пациентов с СД1 (табл. 3).

Таким образом, показано, что антителопродукция была более выражена у пациентов с латентным аутоиммунным диабетом взрослых. Полученные данные согласуются с концепцией о связи активности гуморальных иммунных реакций с более длительной сохранностью инсулин-продуцирующей функции поджелудочной железы при LADA, по сравнению с СД1 [Andersen M.K. et al., 2010; Tuomi T. et al., 2010; Zhang Y. et al., 2010; Maruyama T. et al., 2011].

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

Показатель	СД1	LADA
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 показателем у пациентов с СД1

При оценке концентрации антител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО) и рецептору тиреотропного гормона (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-рТТГ в крови заметно увеличивалась при тиреотоксикозе (табл. 4).

Приведенные факты могут свидетельствовать о том, что при АИТ напряженность иммунного ответа поддерживается на высоком уровне, независимо от гормонального статуса. Можно также отметить, что для БГ характерно сочетание процессов 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].

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

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

Примечание: p₁ – достоверность отличий относительно аналогичного показателя у пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p₂ – у пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p₃ – у пациентов с БГ в фазе эутиреоза

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

У обследованных больных аутоиммунным СД было выявлено усиление продукции IL-2 и увеличение в крови числа лимфоцитов, несущих мембранные рецепторы к IL-4 (CD124⁺-клетки), концентрация IL-4 оставалась на уровне контрольных значений (кроме пациентов с LADA, имеющих микроангиопатии) (рис. 1). По нашему мнению, данные факты являются отражением дисбаланса механизмов антагонизма, в норме существующих между Th1- и Th2-лимфоцитами, что может способствовать хронической стимуляции пролиферации T-лимфоцитов IL-2 и поддержанию аутореактивных процессов в поджелудочной железе. Подтверждением связи нарушения в системе цитокинов IL-2 и IL-4 с развитием аутоиммунного СД является сохранение баланса повышенной продукции IL-4 и увеличенного числа CD124⁺-лимфоцитов в крови (при повышенных концентрациях IL-2) у пациентов с СД2, относительно соответствующих значений у здоровых доноров (рис. 1).

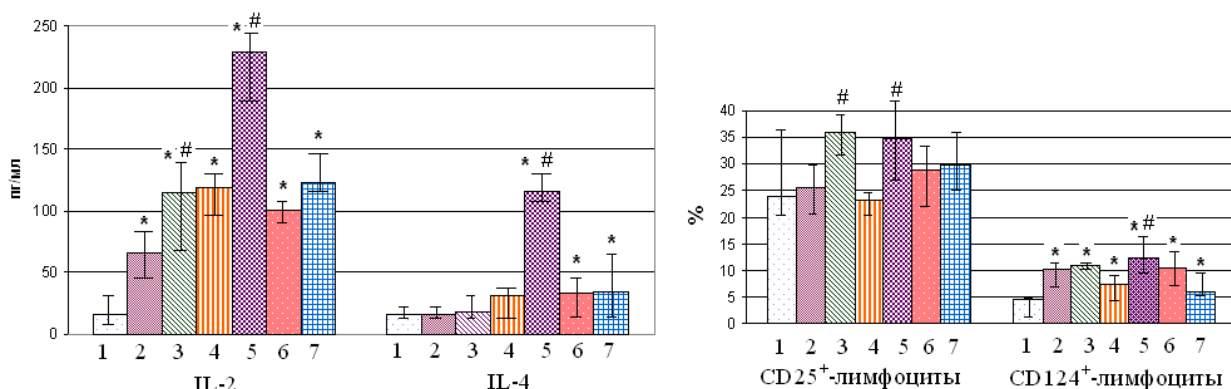


Рис. 1. Содержание IL-2, IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2 (CD25⁺-лимфоциты), к IL-4 (CD124⁺-лимфоциты) (%), у пациентов с сахарным диабетом

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

Характерным для больных СД1 и LADA оказалось значимое снижение концентрации sTNF-R1 в культурах мононуклеарных лейкоцитов крови (рис. 2). Известно, что sTNF-R1 является регулятором провоспалительного действия TNF α [Locksley R.M. et al., 2001; Wajant H. et al., 2003]. Можно предположить, что

дефицит растворимой формы рецептора к TNF α приводит к тому, что концентрация воздействующего на клетки-мишени TNF α возрастает, несмотря на то, что продукция самого цитокина не увеличивается.

Основными результатами изучения состояния системы IL-2, IL-4, TNF α и их рецепторов у больных аутоиммунным СД, имеющих диабетические микроангиопатии, явились данные о повышении концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов IL-2, IL-4 и TNF α , а также увеличении количества CD25 $^{+}$, CD124 $^{+}$, CD120 $^{+}$ -лимфоцитов в крови у пациентов с LADA. Значения данных параметров превышали аналогичные величины у здоровых доноров, у пациентов с LADA, не имеющих микроангиопатий, и у больных СД1 и СД2 с нефро-, ретинопатией (рис. 1, 2).

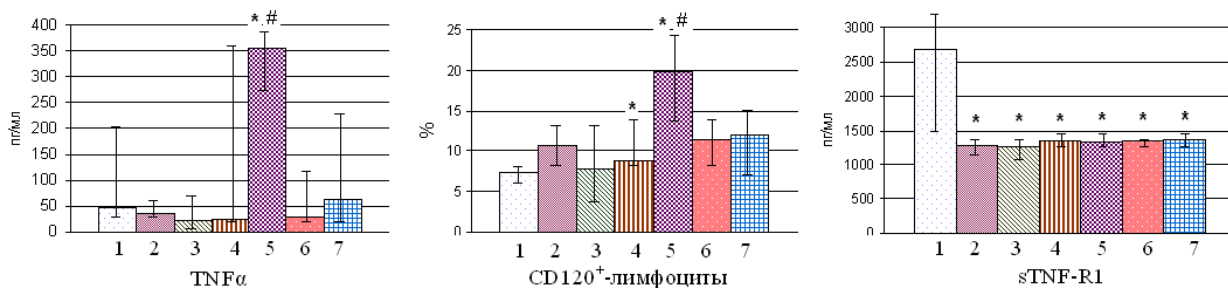


Рис. 2. Содержание TNF α , растворимого рецептора к TNF α (sTNF-R1) в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF α (CD120 $^{+}$ -лимфоциты) (%), у пациентов с сахарным диабетом

Таким образом, нами установлено, что раннее (по сравнению с СД1) развитие микроангиопатий при LADA происходит на фоне повышенного уровня продукции лимфоцитами цитокинов IL2, IL4, TNF α , а также резкого падения концентрации С-пептида в крови (табл. 1).

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

В случае аутоиммунных тиреопатий при оценке состояния системы цитокинов IL-2, IL-4 и их рецепторов выявлена зависимость изменения концентрации IL-2 от уровня тиреоидных гормонов. Содержание IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов у пациентов в состоянии гипотиреоза оказалось ниже контрольных значений, в то время как состояние гипертиреоза у больных было ассоциировано с повышенным содержанием IL-2 в культуральных средах (рис. 3). Полученные результаты подтверждают данные литературы о связи тиреоидного статуса с активностью иммунных реакций [Красных М.С. и соавт., 2004; Botella-Carretero J. et al., 2005; Hodkinson C.F. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт. 2011].

При аутоиммунных тиреопатиях (подобно аутоиммунному сахарному диабету) установлено увеличение количества лимфоцитов крови, презентующих рецептор к IL-4, по сравнению с таковым у здоровых лиц, при отсутствии изменений концентрации IL-4 в супернатантах клеточных культур (рис. 3).

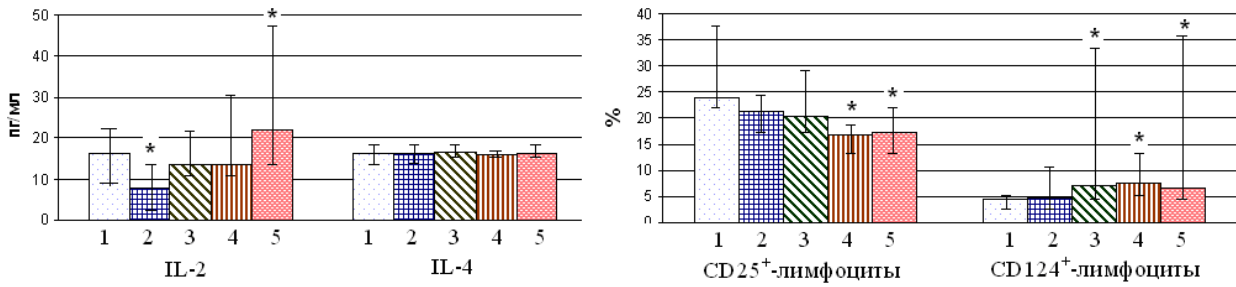


Рис. 3. Содержание IL-2 и IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2 (CD25⁺-лимфоциты) и к IL-4 (CD124⁺-лимфоциты) (%), у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Примечание (здесь и на рис. 4, 5): 1 – здоровые доноры; 2 – больные аутоиммунным тиреоидитом с гипотиреозом; 3 – больные аутоиммунным тиреоидитом в состоянии эутиреоза; 4 – пациенты с болезнью Грейвса в состоянии эутиреоза; пациенты с болезнью Грейвса с гипертиреозом. Здесь и на рис. 5: * - достоверность различий с показателем у здоровых доноров

Комплексная оценка состояния системы TNF α у пациентов с тиреопатиями аутоиммунного генеза выявила угнетение базальной и митоген-стимулированной продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови в условиях *in vitro*, снижение содержания sTNF-R1, а также уменьшение количества лимфоцитов, презентующих мембраносвязанный рецептор к TNF α , как при АИТ, так и при БГ (рис. 4, 5).

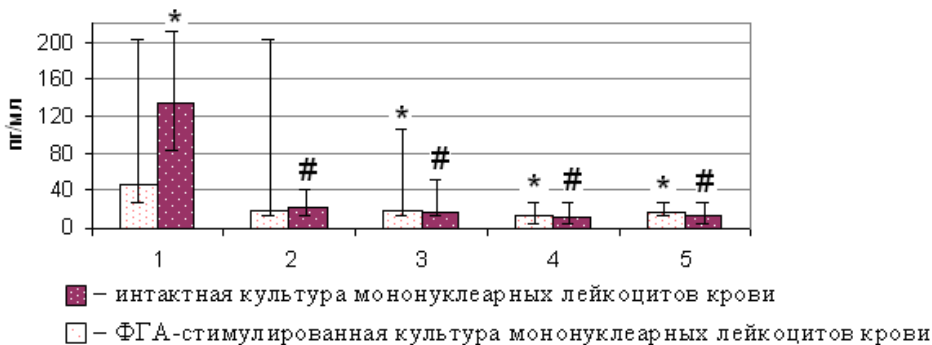


Рис. 4. Концентрация TNF α (пг/мл) в супернатантах интактных и митоген-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у больных аутоиммунными тиреопатиями

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

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

Обобщая сказанное, можно утверждать, что у пациентов с аутоиммунными заболеваниями поджелудочной и щитовидной желез нарушен баланс цитокиновой сети.

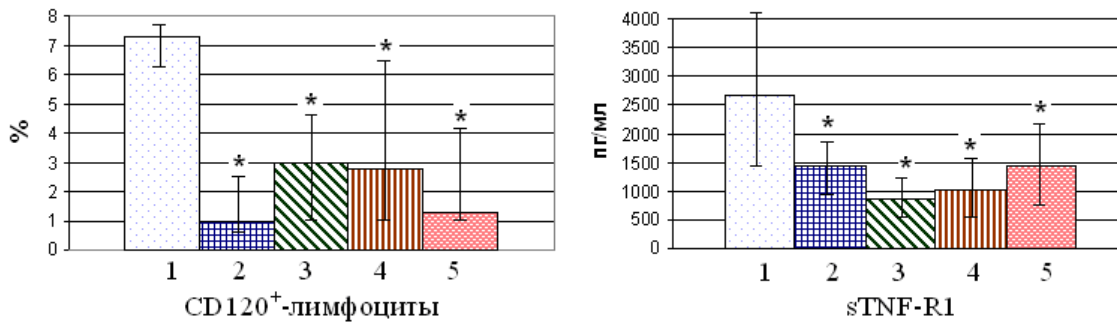


Рис. 5. Количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к TNF α (CD120⁺-лимфоциты) (%), и содержание растворимого рецептора к TNF α (sTNF-R1) в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Наибольшие изменения концентрации IL-2, IL-4 и TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и отклонения в презентации мембран-ассоциированных рецепторов к указанным цитокинам на циркулирующих лимфоцитах крови отмечались в условиях выраженных гормонально-метаболических нарушений: при появлении микроангиопатий у пациентов с сахарным диабетом аутоиммунного генеза, а также при гипо- и гипертиреозе у больных аутоиммунными тиреопатиями (рис. 6).

Для выявления комплекса наиболее информативных показателей, ассоциированных с развитием аутоиммунного повреждения щитовидной и поджелудочной желез, нами был проведен дискриминантный анализ данных. В случае определения в качестве группирующего признака «аутоиммунный сахарный диабет» было обосновано, что наибольший вклад в значение дискриминантной функции, разделяющей группы здоровых лиц и больных СД, вносит показатель продукции мононуклеарными лейкоцитами крови IL-2. Помимо этого, в дискриминантное уравнение вошли показатели концентрации TNF α и количества Th-лимфоцитов в крови (табл. 5).

Таблица 5

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

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

Каноническое дискриминантное уравнение имело вид:

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

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

Аналогичным образом, при использовании в качестве группирующего признака «аутоиммунные тиреопатии» в дискриминантное уравнение были включены значения таких переменных, как количество NK-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, CD4⁺-, CD8⁺- и В-клеток, а также концентрации в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови IL-2, IL-4 и TNFα (табл. 6).

Каноническое дискриминантное уравнение, полученное при решении классификационной задачи, имело вид:

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

Таблица 6

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции (группирующий признак – тиреопатии)

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

Результаты классификации здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными тиреопатиями, полученные в данной модели, показали, что относительная частота принятия безошибочных решений, как по отношению к истинно больным, так и истинно здоровым составляет 70,3%, чувствительность – 73% и специфичность – 67%.

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

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 в крови количества лимфоцитов, презентующих к ним рецепторы. Очевидно, что нарушения баланса в системе цитокинов являются одним из факторов, способствующих поддержанию воспалительного процесса (рис. 6). 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 нами 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. 6).

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.

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.

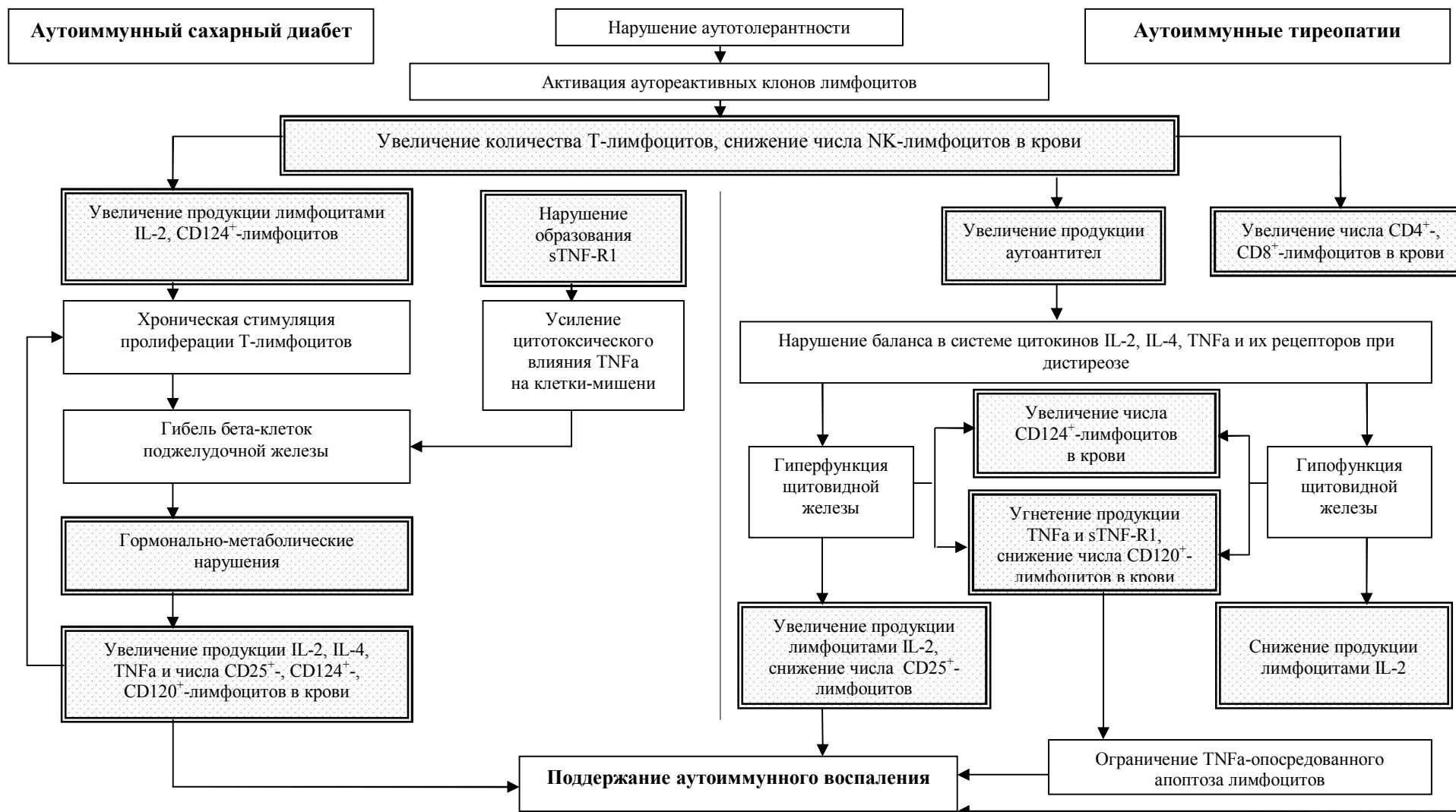


Рис.6. Цитокинопосредованные механизмы развития аутоиммунных эндокринопатий [по данным A.G. Gianoukakis et al., 2008; H. Korf et al., 2010; Е.А. Репиной, 2010; А.В. Андреевой и соавт., 2011 и результатам собственных исследований (выделено серым)]

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Показатели базальной и ФГА-стимулированной продукции интерлейкинов 2 и 4 мононуклеарами при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии: Материалы научной конференции, г. Томск, 22-23 октября 2009. – С. 211-213.
2. Роль TNF и IL-10 в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко // Актуальные вопросы эндокринологии: Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 18–19 ноября 2010 г. – С. 32-33.
3. Роль Th1/Th2-поляризации иммунного ответа в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева // Актуальные проблемы медицины: Материалы конференции с международным участием, г. Абакан, 4-5 мая 2010 г. – С. 368-371.
4. Роль цитокинов в патогенезе аутоиммунного диабета, вопросы иммуоинтервенции / Е.Б. Кравец, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2010. – № 1. – С. 76-83.
5. Гетерогенность сахарного диабета с позиции Th1/Th2-дисбаланса иммунного ответа / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы межгородской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2010 г. – С. 148-150.
6. Особенности базальной и стимулированной секреции интерлейкинов 2 и 4 мононуклеарами крови при аутоиммунном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, В.А. Столярова, Н.В. Рязанцева // **Сибирский медицинский журнал**. – 2010. – № 1. – С.41-44.
7. Цитокиноопосредованные механизмы детерминации клинического фенотипа аутоиммунного диабета / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко // Материалам XI конгресса молодых ученых и специалистов, г. Томск, 27-28 мая 2010 г. – С.15-17.
8. Цитокиноопосредованные механизмы формирования аутоиммунных тиреопатий / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Клиническая экспериментальная тиреоидология**. – 2010. – № 4. – С. 22-27.
9. Участие системы фактора некроза опухолей α в реализации клинического фенотипа аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.М. Резцова, К.О. Завгородская // Актуальные проблемы медицины: Материалы 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля 2011 г. – С. 228-230.
10. Молекулярно-генетические механизмы дисрегуляции системы цитокинов и их рецепторов при социально значимых заболеваниях инфекционного и неинфекционного генеза / А.П. Зима, Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Дни иммунологии в Сибири: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля 2011 г. – С. 54-55.
11. Система фактора некроза опухолей α в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, И.Н. Ворожцова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – №.1 – С. 64-69.

12. Роль Th1/Th2 дисбаланса иммунного ответа в детерминации клинических особенностей аутоиммунного сахарного диабета взрослых / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Сахарный диабет**. – 2011. – № 2. – С. 12-17.
13. Роль интерлейкина-2 и интерлейкина-4 и их рецепторов в иммуноопосредованных механизмах развития аутоиммунного тиреоидита / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, И.Н. Ворожцова и др. // **Сибирский медицинский журнал**. – 2011. Т. 26. – № 4. – С. 186-189.
14. Особенности продукции и рецепции интерлейкина-2 мононуклеарными лейкоцитами крови при аутоиммунном сахарном диабете / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // **Сибирский медицинский журнал**. – 2011. – Т. 26, № 4. – С. 65-70.
15. Status of cytokines and their receptors in the genesis of autoimmune endocrinopathy / T.V. Saprina, T.S. Prokhorenko, A.P. Zima, N.V. Ryazantseva, V.V. Novitsky // II International Scientific Conference "Future development of Science and Technology - 2011", Przemysl, 7-15 nov. 2011. – P.66-68.
16. Особенности продукции и рецепции цитокинов Th1/Th2-профиля при болезни Грейвса / Т.В. Саприна, Т.С. Прохоренко, В.М. Резцова, А.П. Зима, С.Ю. Мартынова, Н.В. и др. // **Клиническая и экспериментальная тиреодология**. – 2012. – №2. – С. 43-49.
17. Особенности продукции цитокинов Th1/Th2-профиля у пациентов с различными клиническими вариантами аутоиммунного сахарного диабета / Т.В. Саприна, Ф.Э. Лазаренко, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, И.Н. Ворожцова // **Цитокины и воспаление**. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51-57.
18. Иммунологические аспекты развития аутоиммунных эндокринопатий / Т.С. Прохоренко, В.А. Прокопьева // Тезисы докладов международной конференции молодых ученых и студентов, г. Архангельск, 16-17 мая 2012 г. – Бюллетень СГМУ. – 2012. – №. 2. – С. 95-96.
19. Иммуно-метаболические аспекты развития микроангиопатий при латентном аутоиммунном диабете взрослых / Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания: современные подходы к диагностике и лечению: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, г. Томск, 24-26 октября 2012. – С. 148-150.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<p>АИТ – аутоиммунный тиреоидит Анти-рТТГ – антитела к рецептору тиреотропного гормона Анти-ТПО – антитела к тиреоидной пероксидазе БГ – болезнь Грейвса СД – сахарный диабет СД1 – сахарный диабет 1 типа СД2 – сахарный диабет 2 типа ТТГ – тиреотропный гормон ФГА – фитогемагглютинин ЩЖ – щитовидная железа</p>	<p>CD – кластер дифференцировки IL – интерлейкин LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых NK – лимфоциты натуральные киллеры sTNF-R1 – растворимый рецептор фактора некроза опухолей α первого типа Th – Т-хелпер TNFα – фактор некроза опухолей α GAD – декарбоксилаза глутаминовой кислоты IAA – антитела к инсулину ICA – антитела к поверхностному антигену β-клетки</p>
---	---