

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

*На правах рукописи*

**Саприна Татьяна Владимировна**

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

14.03.03 – патологическая физиология

14.01.02 – эндокринология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,  
профессор  
Н.В. Рязанцева

доктор медицинских наук,  
профессор  
И.Н. Ворожцова

Томск-2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Современные представления о молекулярных механизмах дизрегуляции иммунной системы при аутоиммунных заболеваниях эндокринной системы	
1.1 Механизмы формирования эндокринопатий аутоиммунного геноза.....	15
1.2 Система цитокинов и их рецепторов, как участник аутоиммунного воспаления.....	30
1.3. Цитокин-опосредованные механизмы развития аутоиммунных заболеваний щитовидной и поджелудочной железы.....	39
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	
2.1. Общая характеристика клинических групп и дизайн исследования.....	48
2.1.1. Клиническая характеристика и принципы стратификации пациентов с сахарным диабетом .....	53
2.1.2. Клиническая характеристика и принципы стратификации пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	62
2.1.3. Методы, используемые для стратификации клинических групп.....	64
2.2. Иммунологические методы исследования	
2.2.1. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови.....	67
2.2.2. Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови.....	68
2.2.3. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови.....	69
2.2.4. Методы оценки системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ .....	70
2.2.4.1 Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови.....	70
2.2.4.2. Определение концентрации растворимого рецептора к TNF- $\alpha$ и sFasL в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови.....	71
2.2.4.3. Определение количества лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ .....	73
2.2.4.4. Оценка количества лимфоцитов крови, презентующих рецепторы цитокинов, CD95 (Fas) и Fas-L.....	73

2.2.5. Оценка уровня аутоантител к структурам поджелудочной и щитовидной железы.....	76
2.2.5.1. Оценка уровня аутоантител к структурам инсулярного аппарата поджелудочной железы.....	76
2.2.5.2. Оценка концентрации аутоантител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы.....	79
2.2.6. Оценка экспрессии рецепторов к IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ фолликулярным эпителием щитовидной железы методом иммуногистохимии.....	81
2.2.7. Статистический анализ результатов исследования.....	86

### ГЛАВА 3. Клинические, метаболические и иммунологические особенности аутоиммунного сахарного диабета

3.1. Клинические особенности манифестного и латентного аутоиммунного сахарного диабета.....	88
3.2. Особенности нарушения метаболизма у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	99
3.3. Особенности продукции и спектр аутоантител к островковым клеткам поджелудочной железы при аутоиммунном сахарном диабете.....	111
3.4. Особенности сахароснижающей терапии у пациентов с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых.....	115
3.5. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	121
3.6. Характеристика цитокин-секретирующей активности моноклеарных лейкоцитов <i>in vitro</i> (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) и содержание Fas+, FasL+, TNF-RI+- лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	136
3.6.1. Секреция <i>in vitro</i> цитокинов Th1-профиля (IL-2, IFN- $\gamma$ ) и количество CD25+- лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	136
3.6.2. Секреция <i>in vitro</i> цитокинов Th2-профиля (IL-4, IL-10) и количество CD124+-, CD210+-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	150
3.6.3. Состояние системы «лиганд-рецептор» TNF- $\alpha$ у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом.....	160

3.6.4. Особенности системы «Fas–FasL–sFasL» у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом .....	171
--	-----

#### ГЛАВА 4. Клинические, метаболические и иммунологические особенности аутоиммунных тиреопатий

4.1. Клинические и метаболические особенности аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и болезни Грейвса (БГ).....	178
4.2. Особенности продукции и спектр аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы при АИТ и БГ...	189
4.3. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	197
4.4. Состояние системы «лиганд-рецептор» IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.....	208
4.5. Характеристика экспрессии рецепторов IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$ в ткани щитовидной железы у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (АИТ и БГ) по результатам иммуногистохимического исследования.....	223

#### ГЛАВА 5. Общие закономерности и особенности цитокинопосредованных механизмов дисрегуляции иммунной системы при эндокринопатиях с различной локализацией аутоиммунного процесса.....

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	283
ВЫВОДЫ.....	296
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	300
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	302
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	306
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	375
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	385
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	387

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

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

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

[Кандрор В.И., 2006, 2008; Pugliese A., 2010; Maruyama T. et al., 2011; Capra M. et al., 2011].

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

### **Степень разработанности темы**

Считается, что аутоиммунное воспаление, лежащее в основе АИТ и СД1, развивается преимущественно по Th1 типу иммунного ответа с преобладанием продукции цитокинов Th1 профиля, которые стимулируют цитотоксическое воздействие иммунцитов на гормон-продуцирующие клетки желез и, в последующем, развитие гипофункции эндокринной железы [Кандрор В.И., 2008; Dardalhon V., 2008; Poncin S. et al., 2008]. Тогда как, для LADA и БГ свойственно преобладание в патогенезе роли Th2 иммунного ответа, способствующего развитию гиперфункции щитовидной железы в случае БГ и длительную сохранность продукции инсулина при LADA [Кандрор В.И., 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2010].

Особая роль в поляризации иммунного ответа, индукции и поддержании аутоиммунного воспаления при указанных заболеваниях отводится цитокинам. Кроме иммуномодулирующего эффекта, цитокины способны регулировать миграцию и секрецию цитотоксических соединений

аутореактивными иммунными клетками, процессы пролиферации и апоптоза иммуноцитов и клеток эндокринных желез, а, следовательно, влиять на функциональную активность гормон-продуцирующих клеток и клиническое течение заболеваний [Weetman A.P., 2004; Дедов И.И. и соавт., 2005; Fang Y. et al., 2008; Poncin S. et al., 2008; Stojanovic J., 2009]. Поэтому поддержание воспаления в органе-мишени либо его разрешение зависит от баланса продукции цитокинов с про- и противовоспалительными функциями, таких как TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, и способности клеток к их рецепции.

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

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

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

**Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями (сахарный диабет 1 типа, латентный аутоиммунный диабет взрослых, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) с учетом клинического варианта и длительности заболевания, характерных для каждой нозологии гормонально-метаболических изменений.
2. Оценить концентрации иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), содержание sTNF-RI и sFasL в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, а также количество IL-2R-, IL-4R-, IL-10R-, TNF-RI-, Fas-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета в зависимости от стажа заболевания, метаболических особенностей заболевания, наличия микрососудистых осложнений.
3. Дать комплексную характеристику состояния цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) и их рецепторов (IL-2R, IL-4R, TNF-RI, sTNF-RI) у больных аутоиммунными тиреопатиями с учетом нозологического варианта (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) и функционального состояния щитовидной железы.
4. Оценить экспрессию рецепторов цитокинов (IL-2R, IL-4R, TNF-RI) в образцах ткани щитовидной железы у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями.
5. Выявить общие закономерности и особенности иммунных нарушений у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями с учетом клинического фенотипа заболеваний: стажа заболевания, метаболических особенностей и наличия микрососудистых осложнений при сахарном диабете; морфофункциональными изменениями щитовидной железы, титром и спектром органо-специфических аутоантител при аутоиммунных тиреопатиях.
6. Разработать прогностические модели для выделения латентного аутоиммунного сахарного диабета среди пациентов с гормонально-метаболическим фенотипом сахарного диабета типа 2, а также



аутоиммунных тиреопатий, основанные на оценке изменений субпопуляционного состава лимфоцитов, цитокин-секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов и количестве лимфоцитов, несущих комплементарные рецепторы.

### **Научная новизна**

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

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

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

Впервые показано, что развитие аутоиммунных тиреопатий сопровождается рядом однонаправленных изменений в иммунной системе: дисбалансом систем цитокинов IL-4 (увеличением количества CD124+-

лимфоцитов при отсутствии изменений секреции IL-4 *in vitro*) и TNF- $\alpha$  (снижением концентраций TNF- $\alpha$  и sTNF-RI в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, а также уменьшением количества CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов). Показано, что при болезни Грейвса, независимо от функционального состояния щитовидной железы, уменьшается количество CD25<sup>+</sup>-экспрессирующих лимфоцитов.

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

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

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови и состояния системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  раскрывают цитокинопосредованные механизмы дисрегуляции иммунной системы при аутоиммунном сахарном диабете и аутоиммунных тиреопатиях.

Установлен комплекс ключевых иммунологических показателей, вовлеченных в патогенез аутоиммунных эндокринопатий и формирование клинических особенностей (темпы развития инсулинопотребности при аутоиммунном сахарном диабете, особенности формирования диабетических микроангиопатий, развитие дистиреоза при аутоиммунных тиреопатиях (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса) и активности аутоиммунного процесса в ткани щитовидной железы, эффективности консервативной терапии при болезни Грейвса).

На основе полученных данных определены потенциальные мишени для иммунотропной терапии аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий.

### **Методология и методы исследования**

Дизайн исследования - открытое когортное, контролируемое, диагностическое (поперечное) исследование.

Методы исследования: клинический блок исследований, иммунологический блок исследований (детекция ауто-антител к антигенам щитовидной железы и  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, определение субпопуляционного состава лимфоцитов, культуральные методы исследования, исследование секреции иммунорегуляторных цитокинов *in vitro*, определение количества лимфоцитов, несущих рецепторы цитокинов), морфологический анализ (гистологический, иммуногистохимический методы исследования), статистическая обработка биомедицинских данных (описательная статистика, корреляционный анализ, сравнение количественных и качественных признаков в 2 и более группах, дискриминантный анализ).

**Положения, выносимые на защиту:**

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

цитокинов (TNF-RI, IL-2R, IL-4R) в ткани щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса не имеет принципиальных различий. При анализе клинических, гормональных иммунологических параметров в соответствии с гистологическими вариантами перестройки паренхимы при болезни Грейвса установлены предикторы клинической гетерогенности течения данного заболевания.

### **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, 2011, 2012, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011), II международном научном конгрессе «Будущее в развитии науки и техники» (Польша, Пшемьсль, 2011), V Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2010), II Съезде терапевтов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010), Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва, 2012), VI Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2013), на заседаниях общества эндокринологов (Томск, 2009-2013).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в лекциях по патологической физиологии (разделы «Патофизиология иммунной системы», «Патофизиология эндокринной системы», «Патофизиология клетки») для студентов 2-3 курсов лечебного и

педиатрического факультетов, в лекциях по эндокринологии, диабетологии, детской эндокринологии, детской диабетологии на 5-6 курсах лечебного и педиатрического факультетов, внедрены в учебный процесс кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики в разделы дисциплин «Молекулярные основы патологии», «Современные проблемы медико-биологической науки» для студентов медико-биологического факультета Сибирского государственного медицинского университета.

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

### **Публикации**

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

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 388 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы (глава 1), материала и методов исследования (глава 2), результатов исследований и их обсуждения (главы 3-5) , заключения, выводов и списка литературы, приложений (3). Работа иллюстрирована 60 таблицами и 44 рисунками, список цитированной литературы включает 801 источника, из них – 98 отечественных, 703 зарубежных авторов.

# **Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ**

## **1.1. Механизмы формирования эндокринопатий аутоиммунного генеза**

Аутоиммунные эндокринопатии относятся к хроническим заболеваниям, при которых развиваются аутоагрессивные органоспецифические реакции, приводящие к дисфункции гормон-продуцирующих структур эндокринной железы. В настоящее время наиболее актуальными проблемами эндокринологии являются такие эндокринопатии аутоиммунного генеза как аутоиммунный сахарный диабет и аутоиммунные тиреопатии (хронический аутоиммунный тиреоидит и болезнь Грейвса), что во многом объясняется не только достаточно высоким уровнем заболеваемости, но и многочисленностью органов и систем, вовлекаемых в патологический процесс, а также существенным ухудшением качества жизни пациентов при данных заболеваниях.

В процессе изучения возможных причин возникновения аутоиммунных эндокринопатий был сформирован ряд концепций. Одной из них является теория молекулярной мимикрии [A.P. Weetman, 2004; Драник Г.Н., 1999; Quarantino S. et al., 2005]. Согласно ей пептиды бактериального происхождения или вирусные белки имеют родственные тиреоидным антигенам эпитопы и нормальный ответ на них иммунной системы приводит к экспансии клонов аутореактивных лимфоцитов, перекрестно реагирующих со структурами неизменной щитовидной железы. Кроме того, вирусы могут непосредственно обладать цитотоксичностью (т.н. «тропизм» к тиреоидной ткани, по аналогии с панкреатотропными вирусами при сахарном диабете 1 типа) и вызывать лизис тиреоцитов с высвобождением свободных аутоантигенов, например, тиреоглобулина, вызывая срыв естественной толерантности и развитие антитиреоидного иммунитета [Tomer Y. et al.,

1993; Bach J.-F. et al., 2005]. Доказанным является также влияние данных вирусов на апоптоз клеток организма, опосредуемый провоспалительными цитокинами. В случае апоптоза клеток, ассоциированных с вирусными инфекциями, изменяется активность системы Fas/FasL. С одной стороны, зараженные вирусом клетки (в данном случае тиреоциты) и клетки иммунной системы запускают процессы Fas-опосредованной гибели, увеличивая экспрессию Fas в клетках-мишенях и FasL в эффекторных клетках с целью элиминации чужеродного генома. С другой стороны, для продолжения репликации вируса специализированные вирусные белки предотвращают развитие апоптоза в инфицированных клетках посредством изменения экспрессии Fas и FasL и ингибирования передачи цитотоксического сигнала. Таким образом, вирусы могут индуцировать или блокировать апоптоз в зараженной клетке, как за счет специфического действия продуктов вирусных генов, так и в результате изменения свойств поверхностной мембраны клетки, что делает ее мишенью для цитотоксических иммунокомпетентных клеток [Wang C. et al., 1997; Weetman A. P, 2001; Stassi G., De Maria R., 2002]. Известно также, что гибель тиреоцитов осуществляется по Fas-зависимому механизму. На поверхности тиреоидных клеток конституционально экспрессируется FasL. Под влиянием IL-1, который продуцируют инфильтрирующие железу макрофаги, индуцируется синтез тиреоцитами антигена Fas. Взаимодействие Fas и FasL ведет к апоптозу клеток щитовидной железы и закономерному развитию гипотиреоза при АИТ.

Предполагают существование мимикрии между бактериальными антигенами *Yersinia Enterocolitica* и антигеном мембраны тиреоцита, включающего рецептор тиреотропного гормона [Wilkin T.J. et al., 1990]. Имеются данные, что существенный вклад в индукцию аутоиммунных тиреопатий оказывают также Эпштейна-Барр вирус, цитомегаловирус [Кравец Е.Б., Уразова О.И., Недосекова Ю.В., 2010].



Установлено, что у ряда вирусов, в частности Коксаки, цитомегаловирусов, часть белковой молекулы состоит из последовательности в 24 аминокислоты, таких же, как в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса. В результате сенсibilизированные к этим вирусам Т-лимфоциты реагируют на собственный белок  $\beta$ -клеток как на вирус, разрушая инсулин-продуцирующую паренхиму поджелудочной железы [Сарвилина И.В. и соавт., 2007]. В щитовидной железе больных тиреоидитом Хашимото часто обнаруживаются вирус гепатита С, парвовирус В19, вирус Коксаки и вирус герпеса, что позволило сформулировать гипотезу о роли вирусной инфекции в возникновении аутоиммунного интратиреоидного воспаления [Mori K., Yoshida K., 2010].

Другие исследования триггерных механизмов указывают на роль в развитии эндокринопатий аутоиммунного генеза факторов окружающей среды неинфекционной природы. Так, например, аутоиммунный тиреоидит вызывали у крыс сильным гамма-облучением [Seddon B. et al., 1999]. Предполагается, что данный эффект связан с модификацией собственных антигенов под действием ионизирующего излучения, в результате чего аутоантигены распознаются иммунной системой как чужеродные [Seddon B., et al., 1999; Сарвилина И.В. и соавт., 2007].

Подобное развитие аутоиммунных заболеваний под действием неблагоприятных внешних факторов во многом обусловлено генетической предрасположенностью. Для аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий выявлена связь с наследованием определенных генов главного комплекса гистосовместимости (HLA), который играет немаловажную роль в реализации иммунного ответа. Установлено, что тиреоидит Хашимото ассоциируется с HLA-DR3-фенотипом [Kahaly G.J., 2007], болезнь Грейвса – с HLA-DR3- и HLA-DRB1-фенотипом [Tommer Y., 2010; Jang H.W. et al., 2011]. Помимо генов, кодирующих молекулу HLA, аутоиммунные тиреопатии связаны с генетической предрасположенностью,

которая определяется полиморфизмом двух генов, регулирующих функцию Т-клеток: CTLA-4 и PTPN-22 [Siminovitch K.A., 2004; Tommer Y., 2010].

Особенно детально исследуется связь различных аллелей HLA с развитием аутоиммунного сахарного диабета. J. Nerup (1989) предложил модель аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток, центральное место в которой отводится антигенам главного комплекса гистосовместимости (HLA), а именно аллелям DR3 и/или DR4, антигенам локуса DQw8 и DQw3,2. Более поздние исследования показали связь с предрасположенностью к развитию аутоиммунного диабета локусов, получивших обозначения IDDM1 и IDDM2, соответственно, определяющих около 42% семейного риска развития аутоиммунного сахарного диабета [Иванов В.И., Киселев Л.Л., 2005]. Исследования, проведенные на линии NOD-мышей, выявили, что развитие аутоиммунного диабета связано с HLA II класса, который кодирует одну молекулу I-Ag7 (ее аналогом у человека является HLA-DQB1) [Atkinson M.A., 1999]. Кроме того, у лиц с данным аллелем, предрасположенных к развитию аутоиммунного сахарного диабета, выявлена нестабильность молекулы HLA и сниженная способность к связыванию Т-клеточного рецептора (TCR) и антигена [Corper A.L., et al., 2000]. Предполагают, что подобный дефект ведет к уменьшению сродства комплекса TCR/антиген/HLA и быстрой диссоциации пептидов в процессе негативной селекции в тимусе. Таким образом, аутореактивные Т-лимфоциты ускользают на периферию. С учетом новых данных, полученных на примере изучения патогенеза аутоиммунного сахарного диабета, сформулирована теория о роли взаимодействия генов, способствующих или препятствующих развитию аутоиммунного заболевания [Atkinson M., 2005; Eisenbarth G., 2001, 2011].

Вторым по значимости генетическим фактором определяющим предрасположенность к СД 1 является локус *IDDM2*, расположенный на хромосоме 11 и отождествляемый с геном инсулина (*INS*). [Bennett S.T., 1995]. В различных популяциях *IDDM2* определяет от 5 до 15% семейного риска развития СД 1. В качестве 3-го локуса предрасположенности к СД 1 в

настоящее время рассматривается аллельный вариант гена, кодирующего лимфоидную тирозинфосфатазу – ген *PTPN-22*, отвечающий за супрессию Т-клеточной активации [Bottini N., 2004; Smyth D., 2004].

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

Рассматривая патогенез аутоиммунного сахарного диабета (СД), следует отметить, что потеря иммунологической толерантности по отношению к  $\beta$ -клеткам поджелудочной железы ведет к постепенной утрате способности железы продуцировать инсулин. В механизмах формирования и прогрессирования аутоиммунного сахарного диабета важная роль принадлежит аутореактивным Т-лимфоцитам и регуляторным Т-клеткам.

В ответ на появление антигенов структурных компонентов инсулинпродуцирующей паренхимы (глутаматдекарбоксилазы (GAD), тирозинфосфатоподобного пептида (IA-2), инсулина (IAA), поверхностного антигена островковых клеток (ICA)) происходит активация Т-клеток, с последующим формированием клеточного инфильтрата поджелудочной железы [Pugliese A., 2010]. При аутореактивном инсулите поджелудочную железу в большом количестве инфильтрируют  $CD4^+$ -лимфоциты Th1 и Th2 типа и цитотоксические  $CD8^+$ -лимфоциты [Dogan Y. et al., 2006], приводя к клеточно-опосредованной аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы путем гибели их в результате апоптоза или некроза. Так, Th-лимфоциты выделяют широкий спектр цитокинов, выполняющих функции медиаторов межклеточной коммуникации, привлекающих в поджелудочную железу различные иммунокомпетентные клетки, а также непосредственно влияющих на  $\beta$ -клетки островков Лангерганса.  $CD8^+$ -клетки, обладая цитотоксической и цитокинпродуцирующей активностью,

также опосредуют механизмы деструкции инсулинпродуцирующей паренхимы [Berner B. et al., 2000; Santangelo C. et al., 2001; Rabinovitch A., 2003; Chang Y. et al., 2005].

Особая роль в патогенезе аутоиммунного диабета принадлежит специализированной субпопуляции Т-клеток – регуляторным Т-лимфоцитам (T-reg), способных подавлять аутоиммунный ответ [Cools N. et al., 2007]. Функциональные свойства Treg опосредованы активностью Fox P3 (forkhead box) [Zheng Y., 2007] - фактора транскрипции, непосредственно и косвенно регулирующего экспрессию более 300 генов. Биологическая функция антигена Т-reg клеток FoxP3 заключается в блокировании транскрипционных факторов NFAT и NF- $\kappa$ B, и, как следствие, депрессии продукции цитокинов (IL-2,-4, IFN $\gamma$ ), а также снижении функциональной активности аутореактивных клеток [Bettelli E. et al., 2005; Rudensky A.Y., et al., 2006] (рис.1). Супрессивная активность Treg непосредственно зависит от интенсивности экспрессии Fox P3 [Pop S.M., 2005]. У пациентов с аутоиммунным диабетом установлено значительное снижение супрессорной функции CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>-T-reg, по сравнению с клетками здоровых доноров, в то время как их количество в периферической крови остается либо нормальным [Lindley S. et al., 2005; Никонова Т.В., 2011] либо снижается [Lawson J.M. et al., 2008]. При LADA функциональный дефицит Treg возникает отсрочено, что, очевидно, обуславливает медленное прогрессирование аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток, несмотря на наличие аутоантител [Никонова Т.В., 2011].

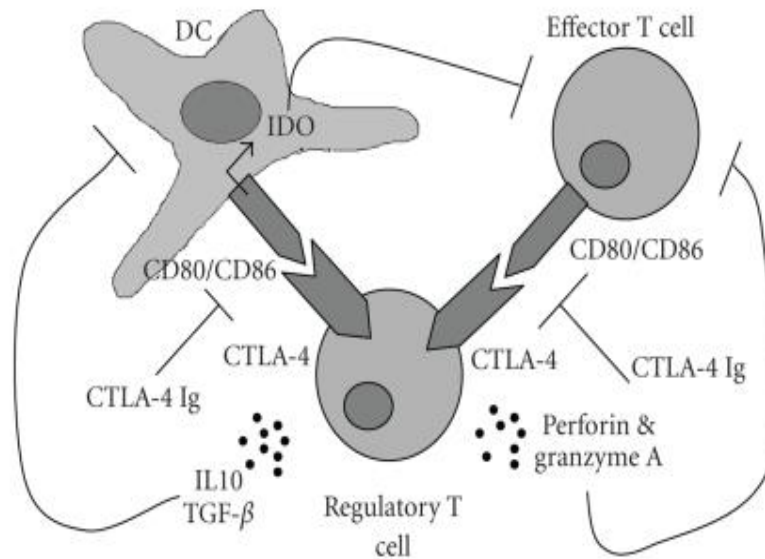


Рис. 1. Механизмы взаимодействия регуляторных Т-клеток (Regulatory T cell) с эффекторными Т-лимфоцитами (Effector T cell) и антигенпредставляющими дендритными клетками (DC) [по данным N. Cools et al., 2007].

Дополнительный вклад в дисбаланс между эффекторными и регуляторными свойствами Т-лимфоцитов вносят такие антигенпредставляющие клетки, как моноциты, макрофаги и, особенно, дендритные клетки [Korfi H. et al., 2010]. При попадании в очаг воспаления незрелые дендритные клетки, взаимодействуя с антигенами и подвергаясь воздействию провоспалительных сигналов, претерпевают процесс созревания и обретают способность стимулировать пролиферацию антигенспецифичных  $CD4^{+}$ - $CD25^{+}$ -Fox P3-Т-клеток [Lam-Tse W.K., 2002], поддерживая тем самым иммунологическую толерантность. При аутоиммунном диабете в эксперименте на линии NOD-мышей выявлено затруднение созревания дендритных клеток и снижение способности к стимуляции ими Т-лимфоцитов [Tandon N. et al., 1994; Many M. et al., 1995; Salmaso C. et al., 2002].

Достаточно давно стало очевидным, что Т-клеточная популяция лимфоцитов не является единственно определяющей развитие аутоиммунного сахарного диабета. Это подтверждает исследование, в котором ингибитор Т-клеток (циклоспорин) не предотвращал развитие

сахарного диабета, а лишь задерживал его [Carel J.C. et al., 1996]. Большой вклад в развитие заболевания вносят В-клетки, роль которых в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета состоит в их активации, сопровождающейся трансформацией в плазматические клетки и наработкой аутоантител к структурам  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Антитела опосредуют комплемент-зависимый и антителозависимый механизм цитотоксичности, в результате чего происходит разрушение инсулин продуцирующей паренхимы. Вместе с тем аутоантитела играют важную роль в возникновении осложнений аутоиммунного диабета [Колесник Ю. М., Орловский М. А., 2004; Storling I. et al., 2005]. Кроме того, исследования последних лет указывают на наличие ряда других функций В-клеток, обеспечивающих им способность влиять на локальные Т-клеточные реакции в поджелудочной железе [Wong F.S. et al., 2010; Chamberlain J.L. et al., 2011], однако, точные их механизмы до конца не ясны.

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

Исследования показывают, что СД1 характеризуется активацией иммунного ответа, который поддерживается Th1 и Th17 клонами лимфоцитов [Dardalhon V., 2008]. Показано, что снижение экспрессии IFN $\gamma$  (маркера Th1) и сдвиг фенотипа Th-клеток от 1-го ко 2-му приводит к уменьшению явлений инсулита и снижению случаев развития СД у NOD-

мышей [Alleva D.G. et al., 2006]. В свою очередь, LADA (диабет, протекающий с преобладанием титров GAD-антител [Amrouche C. et al., 2008; Andersen M.K. et al., 2010; Maruyama T. et al., 2011]) связан с преимущественной наработкой Th2 клонов лимфоцитов [Zhang Y. et al., 2010]. Данный факт дает возможность предполагать, что более длительная сохранность инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы при LADA обусловлена преобладанием активации гуморальных иммунных реакций.

Особое значение в патогенезе LADA отводится глутаматдекарбоксилазе (GAD65) – антигену, экспрессирующемуся в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы. Исследования показали, что введение пациентам с LADA рекомбинантной изоформы GAD65 способствует восстановлению иммунологической толерантности посредством индукции пролиферации GAD65-специфичных регуляторных Т-клеток [Agardh C.D. et al., 2005] и последующим снижением антителопродукции В-лимфоцитами.

Кроме того, при LADA отмечено повышение относительного содержания CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в сравнении со здоровыми лицами, а также повышение относительного содержания Т-регуляторных клеток, сочетающихся со снижением экспрессии на них молекул FOXP3, что указывает на дефект их супрессорной функции [Yang Z.F., et al., 2006, 2007]. В работе Akesson C. (2010) показано, что у пациентов с LADA, по сравнению с больными СД1 манифестного течения и здоровыми людьми, содержание в крови NK-лимфоцитов снижено. В тоже время в популяции NK-клеток у больных LADA исследователи отмечали уменьшение экспрессии иммуноглобулин-подобного рецептора Kir, обеспечивающего киллерную функцию иммунных клеток [Akesson C. et al., 2010]. Наряду с этим в ряде работ отечественных авторов различий в субпопуляционном составе лимфоцитов (CD4, CD8, CD16, CD19) у пациентов с СД1, LADA и здоровыми лицами обнаружено не было [Дедов И.И. и соавт., 2005].

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

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

Как и в случае аутоиммунного сахарного диабета, в регуляцию клеточно-опосредованного иммунного ответа при хроническом аутоиммунном тиреоидите вовлечены  $CD8^{+}$ -лимфоциты и Th-клоны лимфоцитов, выделяющие цитокины различного спектра действия. В патогенезе АИТ преобладающим считают Th1-иммунный ответ, но исследования показывают, что при этом также реализуют свое действие Th2- и Th3-клоны лимфоцитов. Th1-клетки посредством локальной продукции цитокинов могут ослабить функцию ЩЖ как непосредственно (прямые ингибирующие эффекты на функциональный статус фолликулярного эпителия), так и за счет уменьшения числа тиреоцитов путем активации их гибели. Th2-клоны лимфоцитов, очевидно, участвуют в контроле производства антител, подавлении иммунного ответа, а синтезируемые цитокины Th2-профиля способны блокировать тиреоспецифический эффект Th1-цитокинов [Poncin S. et al., 2008].

Активация гуморального звена иммунитета путем взаимодействия Th-лимфоцитов с В-клетками в присутствии аутоантигенов сопровождается синтезом аутоантител к структурам фолликулярного эпителия. Считается, что наиболее выраженное цитотоксическое действие на тиреоциты



оказывают антитела к ТПО. Они фиксируют на своих специфических участках связывания комплемент и тем самым определяют антителозависимую и комплемент-опосредованную цитотоксичность [Кандрор В.И., 2006]. В отношении антител к ТГ установлено, что они обладают цитотоксическим потенциалом, но в комплемент-зависимом цитолизе ткани ЩЖ участия не принимают [Barsouk A. et al., 1996]. ТПО, являясь в отличие от ТГ мембраносвязанным белком, также играет ключевую роль в биосинтезе тиреоидных гормонов. Этот фермент способен осуществлять модификацию антигенных свойств ТГ. ТПО – активный “участник” процессов комплемент-опосредованной и антителозависимой цитотоксичности [Okosieme O.E., Premawardhana L.D., Jayasinghe A. et al., 2005; McLachlan S.M., Rapoport B., 2004].

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

При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с АИТ в периферической крови в ряде исследований было выявлено повышение содержания Th-лимфоцитов, NK- и В-клеток, в то время как

количество цитотоксических  $CD8^+$ -лимфоцитов оказывалось сниженным [Massart C. et al., 1999; Геворкян А.Г. и соавт., 2007]. Также имеются данные о снижении в крови общего количества Т-лимфоцитов и повышении уровня В-лимфоцитов в фазу эутиреоза, тогда как дефицит цитотоксических  $CD8^+$ -клеток выявлялся только в стадии гипотиреоза [Глазанова Т.В. и соавт., 2000; Дамбаева И.М. и соавт., 2007].

Болезнь Грейвса (БГ) клинически проявляется поражением щитовидной железы (ЩЖ) с развитием синдрома тиреотоксикоза в сочетании с экстратиреоидной патологией (эндокринная офтальмопатия, претибиальная микседема, акропатия). В патогенезе БГ особое значение придается образованию стимулирующих антител к рецептору ТТГ (АТ-рТТГ). Эти антитела связываются с рецептором ТТГ, приводят его в активное состояние, запуская внутриклеточные системы (каскады цАМФ и фосфоинозитолов), которые стимулируют захват ЩЖ йода, синтез и высвобождение тиреоидных гормонов. В результате развивается синдром тиреотоксикоза, доминирующий в клинической картине БГ [Фадеев В.В., Мельниченко Г.А., 2005].

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

Предполагается что, помимо активации пролиферации, увеличение количества тиреоцитов при БГ связано с замедлением их спонтанной или

индуцированной гибели. Рядом исследователей установлено, что титр антител к тиреоидной пероксидазе при БГ намного ниже, чем при АИТ, в результате чего минимизируются эффекты антителозависимой комплемент-опосредованной цитотоксичности [Кандрор В.И. и соавт., 2006; Исаева М.А. и соавт., 2007]. Изучение механизмов апоптотической гибели тиреоцитов выявило ограничение презентации на мембране данных клеток Fas-рецептора [Крайнова С.И. и соавт., 2004], что может защищать тиреоциты от воздействия FasL-экспрессирующих лимфоцитов.

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

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

Данные о состоянии субпопуляционного состава лимфоцитов при БГ противоречивы. Так, в периферической крови ряд авторов обнаруживает снижение числа  $CD3^{+}$ -клеток при повышении количества  $CD8^{+}$ - и  $CD19^{+}$ -лимфоцитов, а также снижение активности Т-регуляторных клеток, нарушение реакции угнетения миграции макрофагов и лимфоцитов [Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2003]. Кроме того, выявлен дефект субпопуляции

натуральных киллеров (NK-клеток), который проявляется как снижением спонтанной и стимулированной IL-2 и IFN $\beta$  цитотоксичности, так и нарушением выработки данными клетками цитокинов, в частности TNF- $\alpha$  [Solerte S.B., 2005]. В других исследованиях указывается как на снижение количества CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и повышение числа NK-клеток, так и отсутствие изменений со стороны данных показателей [Геворкян А.Г. и соавт., 2007; Савченко А.А. и соавт., 2008].

Установлено также, что в патогенез АИТ и БГ вовлечены дендритные клетки. В исследованиях на линии BB-DP крыс дендритные клетки, инфильтрирующие щитовидную железу, подобно дендритным клеткам, присутствующим в инфильтрате поджелудочной железы при аутоиммунном СД, находились в незрелом состоянии [Simons P.J. et al., 2000]. Однако точные механизмы данного дефекта не установлены.

Рассматривая аутоиммунные заболевания поджелудочной и щитовидной железы, нельзя не упомянуть о существовании сочетанных вариантов данных эндокринопатий. Аутоиммунный полигландулярный синдром (АПС) характеризуется аутоиммунным механизмом поражения двух и более эндокринных желез [Kahaly G.J., 2007]. АПС 1 типа является аутосомно-рецессивным заболеванием, обусловленным мутацией гена AIRE, в результате которой нарушается экспрессия органоспецифических аутоантигенов в тимусе в период формирования Т-клеток. Это приводит к нарушению иммунной ауторегуляции, в том числе и по отношению к аутоантигенам щитовидной и поджелудочной железы [Liston A., 2004]. Для данного типа АПС основными компонентами являются гипопаратиреоз и болезнь Аддисона. Аутоиммунный сахарный диабет в данном случае является дополнительным компонентом синдрома и в ряде случаев может отсутствовать. В отличие от АПС 1 типа, АПС 2 типа наследуется аутосомно-доминантно, при этом тремя основными составляющими этого синдрома являются аутоиммунная патология щитовидной железы, сахарный диабет 1 типа и болезнь Аддисона. У пациентов с АПС 2 типа определяется более

выраженная, чем при спорадически встречающихся аутоиммунных заболеваниях, ассоциация с гаплотипами HLA-A1, -B8, -DR3 [Weetman A.P., 2005]. Исследование показало, что при АПС 2 типа определяется дефект регуляторных Т-лимфоцитов. Так,  $CD4^{+}$ - $CD25^{+}$ -FOXP3-Т-клетки имели нормальный фенотип, но у них обнаруживалось нарушение способности подавлять пролиферацию аутореактивных Т-клеток [Ehrenstein M.R. et al., 2004; Kriegel M.A. et al., 2004]. Помимо нарушения функции регуляторных лимфоцитов, как и в случае изолированных вариантов эндокринопатий, для сочетанных аутоиммунных заболеваний характерна вовлеченность в патогенез дефекта функции дендритных клеток, цитотоксических, Th1- и Th2-лимфоцитов, дизрегуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток и клеток эндокринных желез [Sakaguchi S., 2000; Betterle C. et al., 2004; Eisenbarth G.S., Gottlieb P.A., 2004; Kriegel M.A. et al., 2004; Kahaly G.J., 2007].

Таким образом, развитие органоспецифических аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез зависит от многих факторов, включая природу аутоантигенов, взаимодействие антигенпредставляющих клеток, особенности представления антигенов Th-лимфоцитам, преобладания активации одного из типов Th-клеток, особенностей формирования цитокиновой сети, соотношения выраженности клеточных и гуморальных компонентов иммунного ответа, а также наследственных вариантов иммунологической реактивности. Это, вероятно, определяет клиническую гетерогенность аутоиммунных заболеваний одной локализации, наличие общих звеньев патогенеза аутоиммунных эндокринопатий с различной локализацией, а также существование сочетанных вариантов эндокринопатий аутоиммунного генеза.

## **1.2. Система цитокинов и их рецепторов, как участник аутоиммунного воспаления**

Цитокины – низкомолекулярные белки с выраженной биологической активностью, являются необходимыми трансмиссерами межклеточного взаимодействия как в норме, так и при патологии. Цитокиновые молекулы участвуют в пролиферации, дифференцировке, репарации, регенерации, клеточной миграции, обеспечивают ответную реакцию на иммунное повреждение и воспаление [Arend W.P., 2001]. Цитокины, как регуляторы иммунологической реактивности, имеют важное значение в развитии многих аутоиммунных процессов, в том числе при эндокринопатиях аутоиммунного генеза. Синтезируясь в очаге воспаления, цитокины воздействуют на макрофаги, гранулоциты, Т- и В-лимфоциты, клетки эндотелия и другие клетки, участвующие в воспалительной реакции [Симбирцев А.С., 2004]. Развитие иммунопатологических состояний, в частности, связанных с развитием аутореактивных состояний, часто ассоциировано с дисбалансом клонов Th-лимфоцитов и спектра продуцируемых ими цитокинов [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Цитокины способны проявлять биологическую активность дистантно, секретируясь в свободном виде клеткой-продуцентом. В некоторых случаях они могут экспрессироваться на поверхности стимулированных клеток в виде мембран-ассоциированных молекул, будучи биологически активными при межклеточном контакте [Симбирцев А.С., 2004; Firestein G. et al., 2006]. Однако, независимо от того, секретируются цитокины или только экспрессируются, они обладают общим свойством – связываются со специфическими рецепторами на клетках-мишенях. Являясь гидрофильными молекулами, цитокины взаимодействуют с соответствующими поверхностными клеточными рецепторами и запускают каскад внутриклеточных сигналов, приводящих к реализации определенного эффекта. Цитокиновые рецепторы не участвуют непосредственно в

регуляции экспрессии генов, а запускают механизм проведения сигнала через плазматическую мембрану за счет активации лиганд-рецепторных комплексов [Пальцев М.А. и соавт., 2003].

Семейство цитокиновых рецепторов по структуре относятся к классу рецепторов, содержащих один трансмембранный домен. Некоторые из них являются мономерами, другие состоят из нескольких субъединиц, формирующих структуру рецептора [Gonda T.J. et al., 1997]. Одни полипептидные цепи, формирующие структуру рецептора, распознают и связывают цитокины, другие служат для генерации сигнала, который передается в клетку [Фаллер Д.М., 2006].

По механизму передачи сигнала цитокиновые рецепторы относятся к рецепторам, не проявляющим каталитической активности, но ассоциированным с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами. Установлено, что связывание с лигандом приводит к димеризации мономерных рецепторов и активации Janus-киназ (JAKs) – тирозинкиназных цитоплазматических белков (JAK1, JAK2, JAK3 и Tyk2), ассоциированных с цитоплазматическим доменом цитокиновых рецепторов через консервативные последовательности рецепторов (рис. 2).

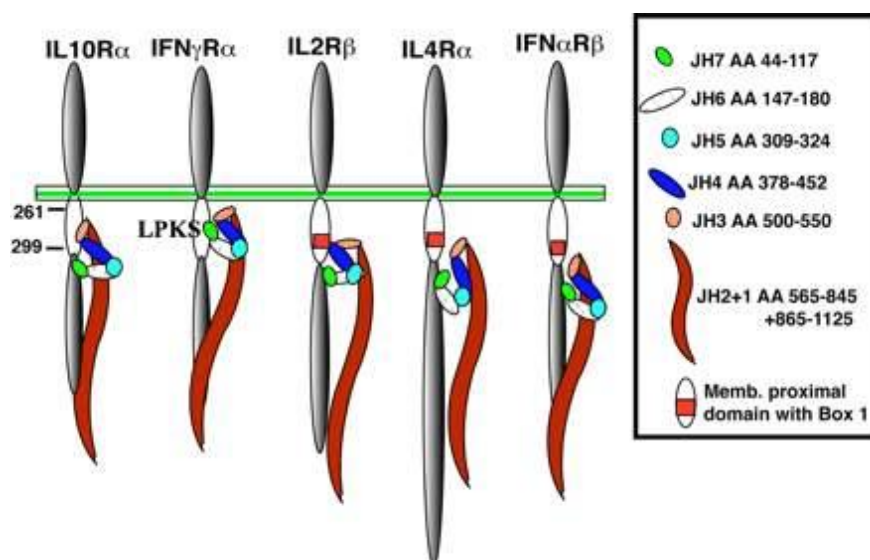


Рис. 2. Схематическое изображение взаимодействия между *Jak1* и различными цитокиновыми рецепторами [по данным Decker T., Kovarik P., 1999; Aaronson D.S., Horvath C.M., 2002]

Активированные JAKs фосфорилируют тирозины в цитоплазматическом домене цитокиновых рецепторов, в результате чего на них образуются сайты для сигнальной трансдукции для молекул, содержащих SH2-домены. Помимо этого, JAKs передают внутриклеточные сигналы через фосфорилированные семейства латентных факторов транскрипции, называемых Stat-белками (signal transducers and activators of transcription). Предполагается, что каждый специфический цитокиновый рецептор передает сигнал с помощью уникального набора киназ и Stat-белков [Decker T., Kovarik P., 1999; Aaronson D.S., Horvath C.M., 2002]. На примере изучения проведения сигнала в клетку от интерферонов различных классов было установлено, что активированные протеинкиназы фосфорилируют цитозольные Stat-белки по остаткам тирозина. Фосфоформы Stat-белков димеризуются путем взаимодействия фосфотирозина одного мономера с SH2-доменом другого, и наоборот. В результате образуются активные гетеродимеры Stat1 – Stat2, которые транслоцируются в ядро, где взаимодействуют с транскрипционными факторами и соединяются с регуляторными специфическими участками генома, активируя экспрессию генов (рис. 3) [Aaronson D.S., Horvath C.M., 2002; Фаллер Д.М., 2006; Watling K.J., 2006]. Установлено, что JAK/Stat-путь опосредует проведение сигнала к пролиферации от IL-2 в эффекторных Т-лимфоцитах при аутоиммунном СД. Обнаружено также, что TGF- $\beta$  ингибирует фосфорилирование и ассоциацию Stat-белков, предотвращая при этом IL-2-зависимую пролиферацию аутореактивных Т-клеток и замедляя развитие СД у NOD-мышей [Han H.S. et al., 1997].

Также, для передачи цитокинового сигнала существует система внутриклеточных протеинкиназ: митогенактивируемых протеинкиназ (MAP-киназ), включающих p38 и JNK, а также фосфатидилинозитол-3-киназу [Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2005]. Высокоактивные провоспалительные цитокины (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ ) активируют p38, JNK и стрессактивируемые протеинкиназы. Они запускают работу белковых



транскрипционных факторов (NF- $\kappa$ B, активационного белка AP-1), передающих сигналы к генам, запускающим синтез воспалительных цитокинов, хемокинов, молекул клеточной адгезии, белков острой фазы и факторов роста [Кулинский В.И., 2007]. В частности, IL-1 активирует MAP-зависимый сигнальный путь в мононуклеарных лейкоцитах крови, приводящий к наработке ими TNF- $\alpha$ .

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

Передача сигнала от IL-2 и IL-6 возможна не только с помощью механизмов Stat или NF- $\kappa$ B, но и с вовлечением Ras-зависимого пути, также сопряженного с протеинкиназами [Потапнев М.П., 2002; Фаллер Д.М., 2006; Roth M. et al., 2006]. Проведение сигнала на белок Ras приводит к активации MAP-киназ и клеточной пролиферации. Этот сигнальный путь является редокс-регулируемым процессом [Matsuzawa A. et al., 2005]. В эксперименте с использованием иммуномодулирующих препаратов одной из причин предотвращения развития диабета у NOD-мышей оказалось улучшение T-клеточной трансдукции сигнала к пролиферации через Ras-белок [Rapoport M.J. et al., 1996], что указывает на участие данного сигнального пути в разрешении аутоиммунной патологии.

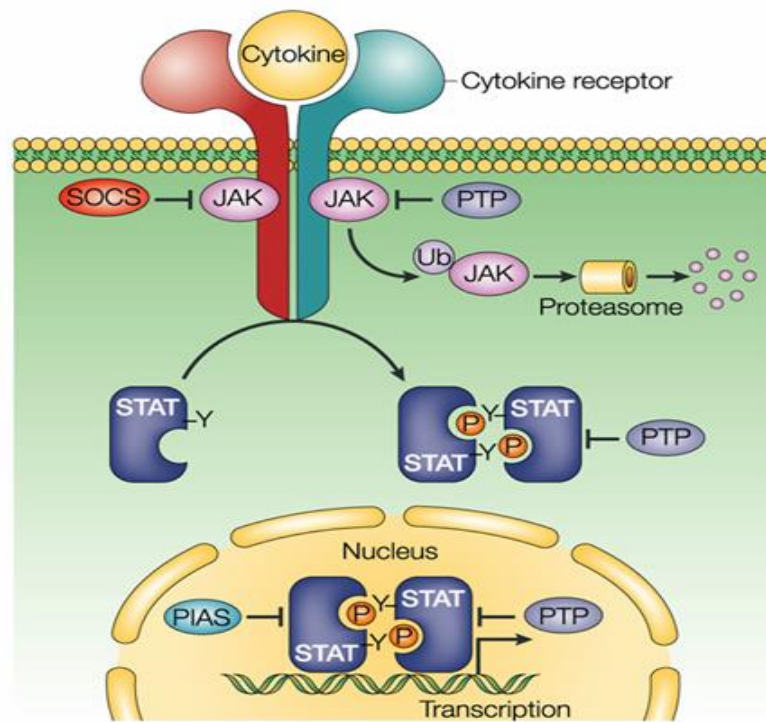


Рис. 3. JAK–STAT – регуляция в иммунной системе [по данным S. Ke, L. Bin, 2003]

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

Регулировать (ингибировать) активность цитокинов способны растворимые формы рецепторов. Данные рецепторы проявляют свое

действие путем связывания свободных цитокинов, предупреждая их взаимодействие со специфическими мембранассоциированными рецепторами [Weckmann A.L., Acoscer-Varela J., 1996]. Эти ингибиторы представляют собой, как правило, экстрацеллюлярный домен мембранных рецепторов, находящихся в растворимой форме. Аффинность растворимых рецепторов к их лигандам обычно сопоставима с таковой мембранных рецепторов. Растворимые рецепторы могут появляться в результате протеолитического воздействия на связанные с мембраной рецепторы или альтернативного синтеза сплайсинговыми мРНК, кодирующими растворимые формы. Помимо торможения активности цитокинов, растворимые рецепторы могут защищать их от протеолитической инактивации, удлиняя, таким образом, период жизни цитокинов [Пальцев М.А. и соавт., 2003].

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

Дифференцировка наивных Т-клеток в Th1- и Th2-направлении сильно зависит от влияния окружающих цитокинов до и после представления антигена. Появление IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток связано с проведением сигнала от IL-12 через активатор транскрипции 4 (Stat4) (рис. 4). Stat4-дефицитные мыши не отвечают на действие IL-12, имеют значительные нарушения в дифференцировке Th1 и склонность к усилению дифференцировки Th2. В противоположность этому, проведение сигнала от IL-4 через Stat6 способствует дифференцировке Th2. Stat6-дефицитные мыши имеют сниженную способность проводить сигнал от IL-4 и угнетают Th2-ответ [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Кроме этого, экспериментальные исследования, проведенные на Stat4- и Stat6-дефицитных мышцах, показали следующее. У Stat6-дефицитных мышечей, в отличие от Stat4-

дефицитных, не развивался гипертиреоз и БГ, что говорит о решающем значении гуморальных иммунных реакций в развитии данного заболевания [Land K.J. et al., 2004]. В другой работе рассмотрено участие Stat4 в формировании Т-опосредованного аутоиммунного диабета. Установлено, что Stat4-дефицитные мыши не заболевали аутоиммунным СД, состояние клеточного иммунитета в данном случае являлось определяющим [D. Homann, A. Holz et al., 1999].

Рассматривая участие цитокинов в аутоиммунном воспалении можно определить следующий спектр эффектов. Гиперпродукция IL-12 сопровождается формированием Th1-ответа, высокой пролиферацией лимфоцитов и продукцией IL-2, IL-17 и IFN $\gamma$ . В модели IL-12R $\beta$ 2 (-/-) нокаут-мышей дендритные клетки способствовали развитию Th2-ответа с низкой продукцией IFN $\gamma$ , что делало экспериментальных животных менее чувствительными к развитию спонтанных аутоиммунных заболеваний [Zhang G. et al., 2003]. Структурным гомологом IL-12 является IL-23, который продуцируется дендритными клетками и становится важным участником патогенеза аутоиммунных заболеваний. Установлено, что IL-23 в значительно большей степени, чем IL-12, активирует Th17-клетки к продукции IL-17, который обладает провоспалительной активностью и является одним из факторов, способствующих развитию аутоиммунных заболеваний. Цитокин IL-23 ответственен за экспансию в очаг воспаления популяции CD4<sup>+</sup>-клеток, продуцирующих IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , но не секретирующих IFN $\gamma$  и IL-4. Было отмечено, что IL-23 повышает продукцию IL-10 CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами [Eijnden S. et al., 2005]. Последующие работы, посвященные изучению IL-17 и IL-23, показали, что более мощным регулятором продукции IL-17, по сравнению с IL-23, являются TGF $\beta$  и IL-6 [Bettelli E. et al., 2006; Mangan P. et al., 2006].

Исследования эффектов IL-17 при аутоиммунных заболеваниях указывают на его выраженную провоспалительную активность в *in vivo* и *in vitro* исследованиях, а также способность индуцировать синтез различных

медиаторов, включая IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  [Sheng X., Xuetao C., 2010]. Этот цитокин секретируется в основном CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами и участвует в развитии ранней стадии аутоиммунного воспаления. Супрессорным эффектом на IL-17 обладает IL-27, опосредующий свое влияние через IL-27R на CD4<sup>+</sup>-клетках. Подавление IL-17 цитокином IL-27 требует активации транскрипционного фактора Stat1. У Stat1-дефицитных мышей повышен пул Th17-клеток, продуцирующих IL-17; в этой связи животные обладают высокой чувствительностью к развитию спонтанных аутоиммунных процессов [Batten M. et al., 2006; Veldhoen M. et al., 2006].

Оценка участия IL-18 в аутоиммунных процессах показала неоднозначность его действия. Например, введение IL-18 NOD-мышам на 4-й неделе жизни приводило к усилению Th1-опосредованного иммунного ответа при развитии СД. При введении на 10-й неделе жизни IL-18 играл супрессорную роль, изменяя Th1/ Th2 баланс [Rothe H. et al., 1999; Oikawa Y. et al., 2003].

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

Провоспалительный цитокин IL-6 усиливает В-клеточную пролиферацию и образование антител, индуцирует продукцию белков острой фазы, которые способствуют активации Т-лимфоцитов антигенпредставляющими клетками [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Уровень продукции IL-6 коррелирует с активностью аутоиммунного

воспаления, а применение специфических к цитокину антител приводит к существенному снижению концентрации острофазных белков [Новиков А.А. и соавт., 2010].

Характерной чертой аутоиммунных заболеваний является повышение числа лимфоцитов периферической крови, которые экспрессируют мРНК IL-1 [Wang X. et al., 2000; Firestein G. et al., 2006]. Данный цитокин существует в форме IL-1 $\alpha$ , способной проводить сигнал в мембраносвязанном состоянии, и IL-1 $\beta$ , действие которого возможно только после перехода в активную растворимую форму посредством взаимодействия с IL-1-конвертирующим ферментом ICE [Firestein G. et al., 2006]. Эффекты IL-1 находятся под контролем естественного рецепторного антагониста IL-1RA, препятствующего связыванию цитокина с его мембранным рецептором (IL-1R). Соотношение продукции эндогенных IL-1 и IL-1RA имеет значение в развитии воспаления, включая тип иммунного ответа, по которому будет развиваться аутоиммунное заболевание [Matsuki I. et al., 2006]. У мышей, склонных к развитию аутореактивных процессов, при дефиците IL-1RA отмечена высокая воспалительная активность заболевания, снижающаяся после введения IL-1RA [Firestein G. et al., 2006].

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

Цитокин IL-10 при аутоиммунных заболеваниях проявляет противовоспалительную активность. Он способен подавлять экспрессию IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ , блокировать Т-клеточный антигенспецифичный ответ, ингибировать активность макрофагов [Новиков А.А. и соавт., 2010]. Однако

часто при аутоиммунных заболеваниях, несмотря на нормальную экспрессию мРНК IL-10 и IL-10R, он не может подавить провоспалительные эффекты цитокинов IL-12 и IFN $\gamma$  ввиду выраженности их повышенной продукции [Balashov K. et al., 2000; Firestein G. et al., 2006].

Таким образом, активация и реализация эффекторных функций клеток, участвующих в развитии аутоиммунного воспалительного процесса, зависят от баланса широкого спектра цитокинов с про- и противовоспалительными свойствами. Различные иммунные клетки могут секретировать аналогичные цитокины, но действовать на разные клетки-мишени. Кроме того, эффект действия цитокинов может меняться в зависимости от концентрации и стадии развития заболевания. Так, в начальной стадии заболевания вовлечение эффекторных и регуляторных клеток в патологический процесс, реализация их способности к продукции и рецепции цитокинов могут ингибировать развитие заболевания, в то время как в острой фазе вовлечение в ауторективный иммунный ответ тех же клеток и медиаторов приводит к деструкции органов и тканей.

### **1.3. Цитокинопосредованные механизмы развития аутоиммунных заболеваний щитовидной и поджелудочной железы**

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

Патогенез аутоиммунного сахарного диабета в основном изучается на животной модели с использованием NOD-мышей, склонных к спонтанному развитию диабета. Эти исследования показывают, аутоантигены в-клеток

поджелудочной железы распознаются молекулами HLA на антигенпредставляющих клетках с последующим представлением их NK-клеткам и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитам [Culina S., Mallone R., 2011]. Активируется наработка хемокинов, способствующая привлечению к панкреатическим островкам из лимфатических узлов эффекторных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Экспрессия на островковых клетках лигандов CXCL10 и CCL2 способствует быстрой миграции моноцитов/макрофагов, опережающей появление аутореактивных Т-клеток. Формированию клеточной инфильтрации сопутствует продукция иммунными клетками цитокинов.

В первую очередь, при развитии панкреатических аутоиммунных процессов, макрофаги и моноциты, NK-клетки периферической крови начинают синтезировать IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Согласно экспериментальным исследованиям, IL-1 $\beta$  рассматривается как ключевой медиатор, вызывающий торможение секреции инсулина и стимулирующий экспрессию гена, кодирующего индуцибельную синтазу азота — NOS2, которая приводит к образованию NO, подавлению пролиферации с последующим повреждением структуры ДНК в-клеток [Колесник Ю.М., Орловский М.А., 2004] (табл. 1). Установлено, что в-клетки подвергаются некрозу под действием IL-1 $\beta$  в присутствии INF $\gamma$  и TNF $\beta$ , избыточного количества свободных радикалов кислорода, оксида азота. Это подтверждено в экспериментах на изолированных островках Лангерганса человека и грызунов *in vitro*. Было показано, что INF $\gamma$  обладает выраженным локальным цитотоксическим действием на инсулинпродуцирующие клетки, усиливающимся при совместном его применении с IL-1 и/или TNF- $\alpha$  [Bruun C. et al., 2005; Chen M. et al., 2005].

Помимо некротической гибели  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, в очаге аутоиммунного воспаления происходит элиминация инсулинпродуцирующей паренхимы путем апоптоза. По результатам биопсии, установлено, что у пациентов с классическим аутоиммунным диабетом типа 1 экспрессия FasL на  $\beta$ -клетках составляет 97%.



Возрастающие концентрации IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  индуцируют экспрессию FasR и TNF-R1 на  $\beta$ -клетках. Кроме того, FasL может поступать паракринно в виде растворимой формы FasL и при непосредственном контакте с FasL-несущими лимфоцитами. Это приводит к индукции специфических ферментов – каспаз, запускающих апоптоз [Колесник Ю. М., Орловский М. А., 2004] (табл. 1). По какому пути пойдет клеточная гибель – некроза или апоптоза – во многом зависит от содержания в клетке АТФ. Дефицит АТФ приводит к утилизации клетки в процессе некроза. При впервые выявленном СД1 отмечено снижение показателя FasR по сравнению с LADA. Это связывают с внутриклеточным дефицитом АТФ при СД1, что приводит к преобладанию некротической гибели  $\beta$ -клеток над апоптотической при СД1, в отличие от постепенно развивающегося аутоиммунного процесса при LADA с преобладанием апоптоза клеток островков Лангерганса [Дедов И.И. и соавт., 2005].

Изучение роли цитокинов с противовоспалительными функциями показало, что IL-4 оказывает защитное действие при аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток у грызунов с аутоиммунным диабетом [Зак К.П., Попова В.В., 2006]. Преинкубация IL-4 с островковыми клетками поджелудочной железы человека полностью предотвращает апоптоз, вызываемый сочетанным действием IL-1, TNF- $\alpha$  и IFN $\gamma$  [Santangelo C. et al., 2001]. Выявленное повышение уровня IL-4 при LADA относят к одному из факторов, приводящих к отсутствию или снижению цитотоксичности Т-лимфоцитов и макрофагов, определяющих более медленное повреждение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [Симбирцев А.С., 2002, 2004] (табл. 1).

При оценке секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами крови у больных с впервые выявленным СД 1 типа установлено значительное снижение его продукции [Rapoport M.J. et al., 1998]. На основании экспериментальных исследований многие авторы относят IL-10 к цитокинам, оказывающим защитное действие при развитии СД1 типа [Rabinovitch A., 2003; Chang Y. et al., 2005]. В то же время существуют работы, в которых на

основании исследования Т-клеток у NOD-мышей не было обнаружено противодиабетического действия IL-10, в отличие от IL-4 [Mi Q.S. et al., 2004].

На стадии предиабета и у недавно заболевших СД людей рядом исследователей отмечалось повышение уровня IL-2 в плазме крови у пациентов, а также значительное возрастание его продукции мононуклеарными лейкоцитами крови [Rapoport M.J. et al., 1998, 2005; Зак К.П., Попова В.В., 2006]. Также имеются работы, в которых сообщается о снижении уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарными лейкоцитами у больных аутоиммунным диабетом (как СД1, так и LADA) [Marchase R.B. et al., 1999; Herold K.C. et al., 2003; Дедов И.И. и соавт., 2005]. К настоящему времени накоплены весьма противоречивые данные и относительно циркулирующего рецептора IL-2 (CD25). Одни авторы сообщают о повышении его концентрации в периферической крови у больных СД1, в том числе в доклиническую стадию развития заболевания [Hussain M.J. et al., 1998], в то время как другие — о снижении данного показателя [Giordano C. et al., 1993]. Кроме того, существуют фактические доказательства, указывающие на то, что повышение уровня рецептора к IL-2 характерно только для больных с пролиферативной ретинопатией [Зак К.П., Попова В.В., 2006].

Таблица 1

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

<b>Провоспалительные эффекты</b>	<b>Протективные эффекты</b>
Прямое цитотоксическое воздействие	Снижение цитотоксичности иммуноцитов
Влияние на экспрессию молекул адгезии	Стимуляция пролиферации Т-регуляторных лимфоцитов
Стимуляция продукции NO и цитокинов	Снижение пролиферации аутореактивных Т-лимфоцитов и распознавания аутоантигенов
Запуск программы апоптоза	Блокирование программы апоптоза

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

Помимо этого проводились экспериментальные работы, направленные на выяснение роли цитокинов в пролиферации, гибели и функциональной активности тиреоцитов.

На культуре тиреоцитов (крысы PCCL3, FRTL-5, и фолликулярный эпителий человека – постоперационный материал) в присутствии цитокинов IL-1 $\alpha$  и IFN $\gamma$ , исследовалось влияние на функциональные показатели тиреоцитов цитокинов Th-2/3 профилей. Было показано, что IL-4 полностью предотвращает альтерацию ткани, вызванную совместным действием цитокинов IL-1 $\alpha$  и IFN $\gamma$ , снижение функции тиреоцитов, определяемую по экспрессии тиреоглобулина и тиреоидной пероксидазы. Воздействие TGF и IL-10 не оказывало блокирующего действия на эффекты сочетанного влияния IL-1 $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Дополнительно показано, что IL-4 уменьшает депрессивные эффекты, вызванные IL-10, но не TGF- $\beta$  [Poncin S. et al., 2008].

Предметом активного изучения в последние десятилетия при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы являлись механизмы апоптотической гибели тиреоцитов. Важным условием индукции Fas-опосредованного апоптоза тиреоидных клеток оказалось сочетанное воздействие на них IFN $\gamma$  и TNF- $\alpha$  [Bretz J.D., 2001]. Также установлено, что

экспрессию Fas-рецептора на клетках щитовидной железы способен индуцировать провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  [Paolieri F., 1999].

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

Последними исследованиями доказана роль IL-10 и CD8<sup>+</sup>-клеток в разрешении аутоиммунных тиреопатий. Показано, что снижение продукции IL-10 и количества CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов ведет к увеличению инфильтрации ткани железы, продукции провоспалительных цитокинов, активации апоптоза клеток тиреоидного эпителия и угнетению апоптоза CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. В случае увеличения продукции IL-10 и количества CD8<sup>+</sup>-клеток ингибируется эффекторная фаза иммунного ответа, происходит разрешение воспалительного ответа через Fas-FasL-механизм, что способствует выживанию тиреоцитов [Fang Y. et al., 2008].

Особенность аутоиммунного воспаления щитовидной железы заключается в том, что фолликулярный эпителий не только отвечает на действие цитокинов, источниками которых являются моноциты и лимфоциты, мигрирующие в ЩЖ из сосудистого русла, но и самостоятельно продуцирует определенные цитокины. Тиреоциты способны синтезировать *in vitro* IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-16, CXCL-19, CXCL-10 и RANTES [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002; Weetman A.P., 2004]. В культуре тиреоцитов также установлена секреция хемокина CXCL-10 в ответ на воздействие IFN $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Рецептором CXCL-10 является CXCR3, экспрессирующийся на лимфоцитах и эндотелиальных клетках в больших количествах, это служит

одним из механизмов формирования лимфоидной инфильтрации ЩЖ. Показано, что уровень сывороточного CXCL-10 увеличивается у пациентов с БГ [Gianoukakis A.G. et al., 2008].

Цитокины IL-1, IFN $\gamma$  и TNF- $\alpha$  стимулируют *in vitro* продукцию цитокинов фолликулярными клетками ЩЖ, что может иметь значение в увеличении инфильтрации железы *in vivo*. Цитокины увеличивают экспрессию молекул адгезии на фолликулярных клетках ЩЖ, а также стимулируют продукцию NO и простагландинов этими клетками, что также имеет значение в локализации и увеличении воспалительной реакции [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002] (табл. 2).

Перекрестное взаимодействие между тиреоцитами и лимфоцитами, инфильтрирующими паренхиму ЩЖ, может происходить через различные сигнальные пути. В частности, задействована молекула CD40, член суперсемейства рецептора TNF-б, способствующая активации В-лимфоцитов. Повышение уровня CD40 было выявлено при БГ, что явилось триггером избыточной продукции IL-10 и активацией гуморального звена иммунитета [Itoh M. et al., 2000]. При этом в культурах тиреоидных клеток CD40 способствовал увеличению продукции IL-6 [Gianoukakis A.G. et al., 2008]. Известно также, что при аутоиммунной патологии щитовидной железы усиление антигенспецифической стимуляции В-лимфоцитов и продукция специфических иммуноглобулинов против различных компонентов фолликулярного эпителия железы происходит под действием цитокинов IL-5, IL-10 и IL-4 [Парахонский А.П., 2005].

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

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

Таблица 2

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

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

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

цитокинового каскада при формировании и прогрессировании заболеваний щитовидной и поджелудочной желез аутоиммунного генеза.

### **Заключение**

Аутоиммунные эндокринопатии различной локализации, безусловно, характеризуются специфическими механизмами взаимодействия иммунокомпетентных клеток и имеющих антигенные структуры клеток органа-мишени. Формирование определенного окружения из антигенпредставляющих клеток и клонов аутореактивных лимфоцитов, их функционирование тесно связано с продукцией цитокинов как иммунными клетками, так и клетками эндокринных желез. В то же время спектр и концентрация цитокинов, а также способность клеток воспринимать от них сигнал через специфические рецепторы во многом определяют характер течения аутоиммунных эндокринопатий. Существующие данные указывают на ряд закономерностей, связанных с деструктивным или протективным влиянием на клетки-мишени некоторых цитокинов, а также зависимостью между функциональным состоянием эндокринной железы и преобладающим типом иммунного ответа (клеточного или гуморального).

Углубленное изучение процессов продукции цитокинов, рецепторпрезентирующей способности иммунокомпетентных клеток крови и их кооперации, по нашему мнению, позволит детализировать существующие на сегодняшний день сведения о патогенезе аутоиммунных эндокринопатий различной локализации, уточнить ряд спорных, с позиции анализа литературных данных, вопросов о развитии изучаемых нозологий. Это, возможно, будет способствовать определению новых подходов к выбору патогенетически обоснованной терапевтической стратегии и разработке молекулярных основ первичной профилактики аутоиммунных эндокринопатий.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Общая характеристика клинических групп и дизайн исследования**

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

В исследовании были выделены четыре основные клинические группы: больные СД1 ( $n=37$ ); больные LADA ( $n=31$ ); пациенты с АИТ ( $n=29$ ); пациенты с болезнью Грейвса ( $n=45$ ). Группу сравнения для больных с сахарным диабетом аутоиммунного генеза составили пациенты с СД2 ( $n=67$ ) (рис. 4). Критериями включения пациентов в исследование явились: четко верифицированный диагноз, возраст больных 18-55 лет на момент скрининга, согласие пациента участвовать в исследовании и способность дать письменное информированное согласие.

Критериями исключения пациентов из программы исследования являлись: беременность женщин или факт кормления грудью в период проведения обследования, наличие на момент скрининга и обследования острых форм и обострения хронических форм инфекционных заболеваний, наличие гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (атопическая болезнь – бронхиальная астма, atopический дерматит и тд.), диагностированное и/или леченное злокачественное заболевание в течение последних 5 лет, инфицированность вирусами гепатитов В, С, D, ВИЧ, донорство одной (500 мл) или более единиц крови, значительная потеря крови в течение последних 2 недель, переливание крови в течение последних 8 недель; длительное пероральное или парентеральное применение кортикостероидов ( $>7$  дней лечения подряд) в течение 4 недель до скрининга, активное злоупотребление



психоактивными веществами в анамнезе (включая алкоголь), установленная гемоглобинопатия или хроническая анемия, применение экспериментальных препаратов в течение 30 дней или 5 периодов полувыведения до скрининга, а также отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие).

В контрольную группу были включены 30 практически здоровых добровольцев (14 мужчин и 16 женщин, средний возраст –  $45,3 \pm 5,6$  лет), с ИМТ от 18 до 27  $\text{кг}/\text{м}^2$ , с верифицированным отсутствием нарушений углеводного обмена и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, с отсутствием аутоантител к структурам инсулярного аппарата поджелудочной железы и фолликулярного эпителия щитовидной железы, с учетом аналогичных критериев исключения из программы исследования.

Дизайн настоящего исследования – одномоментное диагностическое (неинтервенционное) исследование, включавшее следующие этапы:

Первый этап (общеклинические методы исследования):

1. Сбор данных клинического обследования больных (анамнеза, жалоб, объективного статуса, визуального и пальпаторного обследования щитовидной железы, клиническая антропометрия), анализ данных медицинской документации.

2. Сбор данных ультразвукового исследования щитовидной железы, органов брюшной полости, офтальмоскопия (заключение окулиста), исследование параметров компенсации углеводного обмена (гликированный гемоглобин – HbA1c), липидограмма, исследование эндогенной секреции инсулина по концентрации в сыворотке крови С-пептида, гликемический профиль, осмотр нижних конечностей и исследование сенсорных и моторных нарушений, определение протеинурии, микроальбуминурии, скорости клубочковой фильтрации, концентрации свободных фракций гормонов  $T_3$ ,  $T_4$  и ТТГ в сыворотке крови, титра сывороточных антител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе,

рецептору ТТГ для дифференциальной диагностики АИТ и БГ.

3. Тонкоигольная аспирационная биопсия щитовидной железы при узловых вариантах патологии щитовидной железы, цитоморфологическое исследование пунктата (по показаниям).

Второй этап (специальные методы исследования):

Материалом для данных исследований являлась стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл) венозная кровь, взятая утром до приема пищи путем пункции локтевой вены.

1. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови (проточная лазерная цитофлуориметрия).

2. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови.

3. Определение концентраций цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) в культуральных средах (иммуноферментный анализ).

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

5. Определение уровня аутоантител к структурам поджелудочной и щитовидной железы.

6. Исследование экспрессии рецепторов цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) в щитовидной железе (операционный материал) методом иммуногистохимии.

Третий этап (обработка результатов исследования):

Статистическая обработка результатов (проверка закона распределения, описательная статистика, дискриминантный анализ),

обсуждение результатов исследования.

Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в табл. 3.

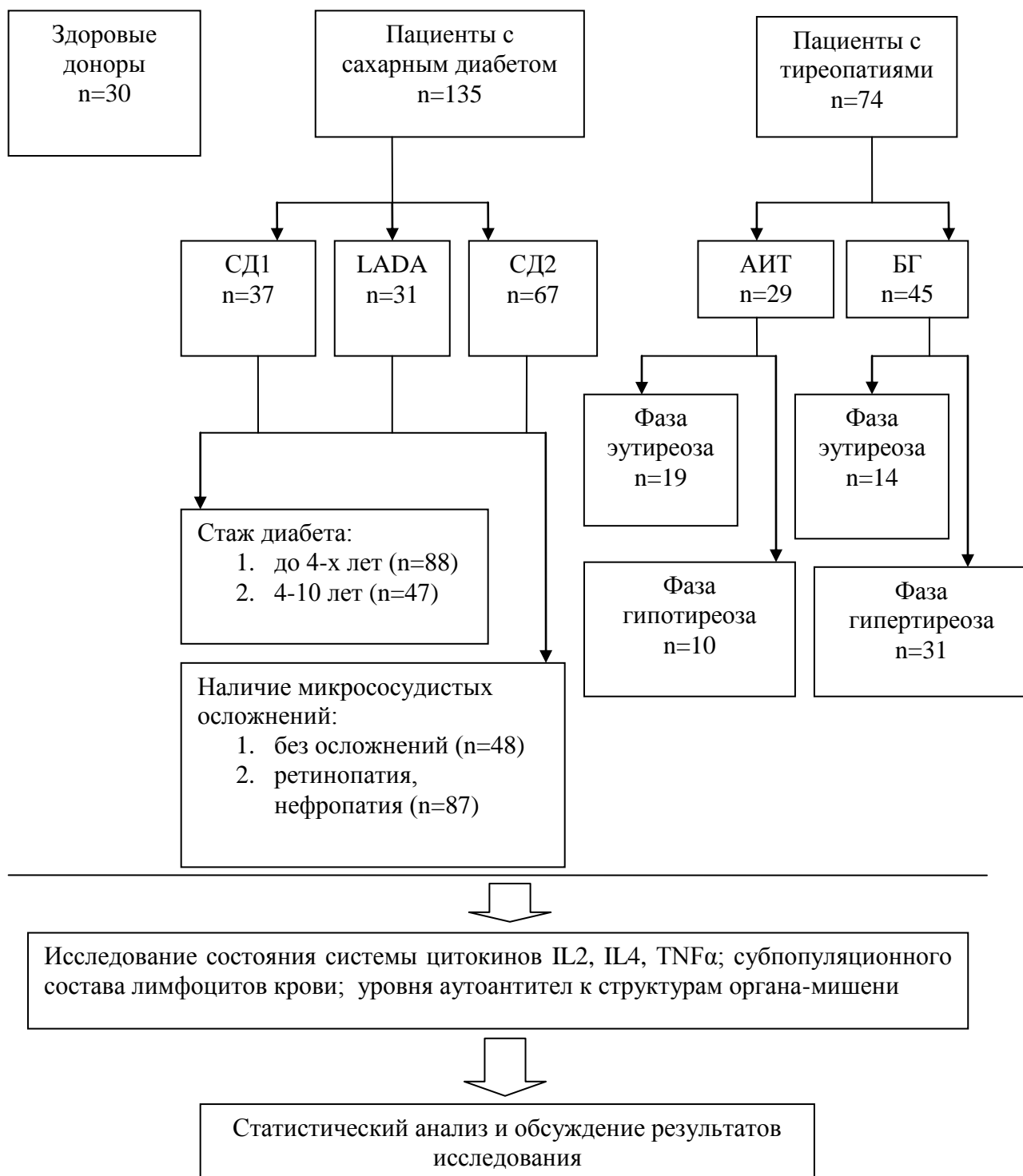


Рис. 4. Дизайн исследования и стратификация клинических групп

Таблица 3

## Распределение здоровых доноров и пациентов в соответствии с использованными методами исследования

№	Методы исследования	Группы обследованных лиц					
		Здоровые доноры	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 CD3-, CD4-, CD8-, CD19-, CD16/56 <sup>low</sup> -маркеры методом проточной лазерной цитофлуориметрии	30	37	31	67	29	45
2	Определение концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови цитокинов (IL2, IL4, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10) и растворимой формы рецептора первого типа к TNF- $\alpha$ , sFasL с использованием ИФА	30	37	31	67	29	45
3	Определение количества рецептор-презентирующих (CD25+, CD124+, CD120+, CD210+, Fas, FasL) лимфоцитов крови методом проточной цитофлуориметрии	30	37	31	67	29	45
4	Определение уровня аутоантител к инсулярному аппарату поджелудочной железы (антитела к инсулину (IAA), к островковым клеткам (ICA), глутаматдекарбоксилазе (GAD)) методом ИФА	30	37	31	67	0	0
5	Определение уровня аутоантител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы (антитела к тиреопероксидазе (анти-ТПО), к рецептору ТТГ (анти-рТТГ)) методом ИФА	30	37	31	67	29	45
6	Определение экспрессии рецепторов IL-2, IL-4, TNF-RI в образцах тканей щитовидной железы (операционный материал) иммуногистохимическим методом	0	0	0	0	4	19

Исследование соответствовало требованиям Локального Этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 946, дата проведения заседания – 16 февраля 2009 г.), разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава Российской Федерации от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, дали информированное согласие. Тема исследования утверждена Ученым Советом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол №5 от 10.04.2009 г.).

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

### **2.1.1. Клиническая характеристика и принципы стратификации пациентов с сахарным диабетом**

Для идентификации роли системы цитокинов и их рецепторов в патогенезе эндокринопатий аутоиммунного генеза в соответствии со сформулированными в диссертационной работе задачами нами было проведено обследование 135 пациентов (63 мужчины и 72 женщины, средний возраст  $41,1 \pm 1,0$  г) с сахарным диабетом, включая 37 лиц с СД1 и 31 – с LADA, а также 67 пациентов с СД2 (рис. 4).

Диагноз сахарного диабета во всех группах выставлен согласно диагностическим критериям СД и других нарушений углеводного обмена (ВОЗ, 1999 г), а также согласно Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятой Всемирной организацией здравоохранения в Женеве в 1995 году (по МКБ-10 рубрики E10, E11 и E13).

При наличии клинических симптомов, указывающих на СД (полидипсия полиурия, снижение массы тела, кетоз и/или кетоацидоз), диагноз подтверждался при проведении гликемического профиля, в котором выявлялась гликемия выше 7,0 ммоль/л натощак, и выше 11,1 ммоль/л через 2 часа после приема пищи (глюкоза определялась в венозной плазме). При отсутствии симптомов СД (характерно для пациентов с СД2) диагноз верифицировался в ходе проведения стандартного теста толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы (7,0 ммоль/л натощак, и выше 11,1 ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой (глюкоза определялась в венозной плазме)).

Диагноз СД и его осложнений устанавливали после детального клинико-инструментального обследования пациентов на базе эндокринологической клиники ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России на основании критериев классификации СД, принятой ВОЗ (1999), «Национальных стандартов оказания помощи больным сахарным диабетом», утвержденных Министерством здравоохранения РФ, а также согласно Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятой Всемирной организацией здравоохранения в Женеве в 1995 году (по МКБ-10 рубрики E10, E11 и E13). При каждом визите уточняли анамнестические данные: стаж диабета, возраст дебюта заболевания, возраст обследуемого, особенности течения заболевания и проводимой терапии. Также уточняли сведения о состоянии здоровья родителей и других родственников. Проводилось обследование в плане наличия хронических осложнений СД, сопутствующей эндокринной (дистиреоз) и соматической патологии (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, хроническая ишемия головного мозга и др.) (табл. 4).

Оценку физического развития осуществляли путем измерения антропометрических показателей: роста и массы тела, окружности талии.

Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле:  $\text{ИМТ} = \text{масса тела} / \text{рост}^2$  (кг/м<sup>2</sup>).

Состояние углеводного обмена оценивали по уровню глюкозы в крови в течение суток с расчетом среднесуточной гликемии и содержанию гликированного гемоглобина (HbA1c). Исследование липидного спектра, включавшее в себя определение уровня общего холестерина и триглицеридов, холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП), проводилось на биохимическом анализаторе «Specific basic» (Финляндия) стандартными методами.

Таблица 4

Распределение обследованных пациентов в соответствии с проведенными параклиническими методами исследования

Лабораторно-инструментальные методы обследования	LADA	СД1	СД2
Общий анализ крови	31	37	67
Биохимический анализ крови	31	37	67
Среднесуточная гликемия	31	37	67
Количественная оценка микроальбуминурии	31	37	67
Исследование суточной мочи на белок	31	37	67
Гликированный гемоглобин (HbA1c)	31	37	67
Определение уровня С-пептида в сыворотке	31	37	67
Липидный спектр сыворотки крови	31	37	67
Свободный тироксин, ТТГ, антитела к тиреопероксидазе	31	37	67
УЗИ органов брюшной полости	31	37	67
УЗИ щитовидной железы	31	37	67
Консультация офтальмолога	31	37	67

Для диагностики диабетической ретинопатии проводили фундоскопическое исследование глазного дна после медикаментозного расширения зрачка.

Диабетическую нефропатию верифицировали по выявлению микроальбуминурии или протеинурии, сывороточному уровню мочевины и креатинина. Диагноз основывался на классификации С. Mogensen et al. (1983). Стадию микроальбуминурии диагностировали при уровне альбумина в моче от 30 до 300 мг в сутки, стадию протеинурии - более 300 мг в сутки. Исследование проводилось только при отсутствии острой или обострения хронической мочевого инфекции.

Выявляли субъективные признаки диабетической полинейропатии: наличие болевого синдрома, онемения, парестезий, жжения преимущественно в нижних отделах конечностей. Объективный статус нижних конечностей начинали с осмотра кожных покровов с выявлением язвенных дефектов, гиперкератоза, деформаций стоп, дистального гипергидроза. Оценка локального кровотока нижних конечностей осуществлялась пальпаторно по пульсации тыльной и заднеберцовой артерий стоп. Наличие и степень выраженности диабетической полинейропатии оценивали на основании сохранения или снижения различных видов чувствительности (тактильной, болевой, температурной и вибрационной), а также сохранения или выпадения коленных и ахилловых рефлексов.

На каждого пациента составляли разработанную нами информационную карту, включающую анамнестические данные, результаты клинических, инструментальных и лабораторных методов исследования, а также сведения о проведенном лечении.



***Принципы и методы исследования, использованные для  
стратификации пациентов с сахарным диабетом***

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

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

Группой сравнения для обследованных пациентов с СД1 и LADA послужили 67 человек с диагнозом СД типа 2, прошедшие первоначальный

клинический и лабораторный скрининг (40 женщин и 27 мужчин, средний возраст –  $46,8 \pm 1,1$  г). Диагноз СД типа 2 устанавливался на основании наличия маркеров метаболического синдрома, постепенного начала заболевания без развития кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 мес от начала заболевания.

Каждая группа пациентов с сахарным диабетом была разделена на подгруппы в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет), наличия микрососудистых осложнений (диабетической ретинопатии, нефропатии).

Подобное разделение пациентов по стажу заболевания связано, с одной стороны, с необходимостью исключить из программы исследования пациентов с макрососудистыми осложнениями, появление которых отмечалось после 10-го года заболевания, а с другой – с выявленными в ходе исследования гормонально-метаболическими закономерностями течения СД1, LADA и СД2 (рис. 5, рис.6).

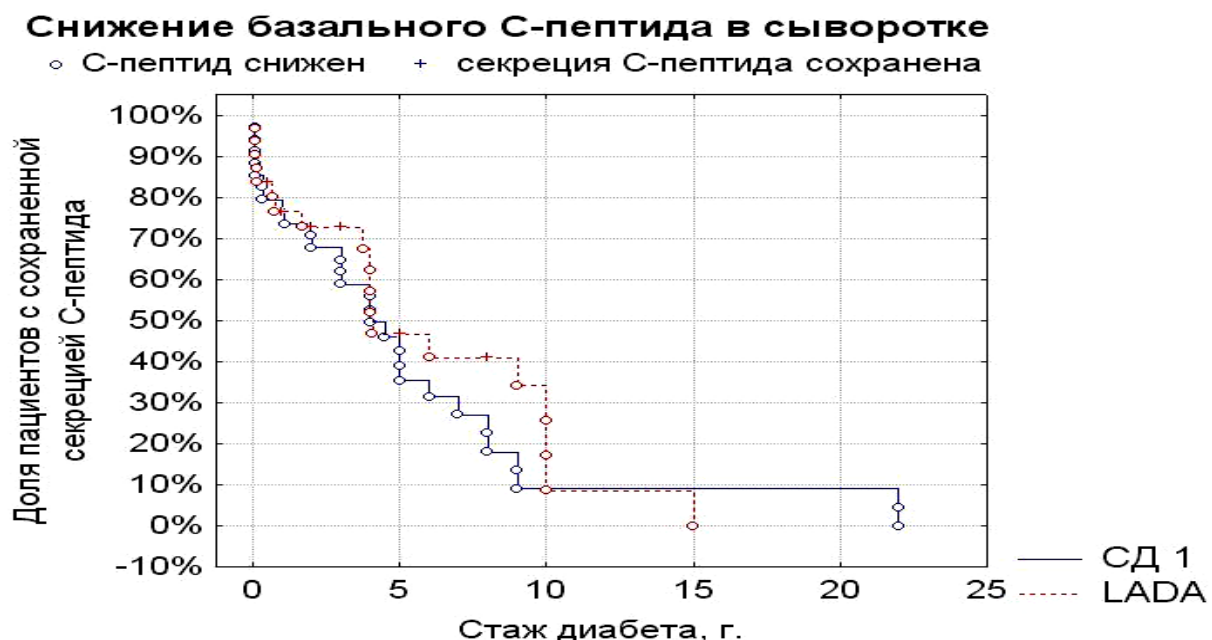


Рис. 5. Динамика концентрации С-пептида натощак в сыворотке крови у больных СД 1, LADA в зависимости от стажа заболевания

Известно, что концентрация С-пептида в сыворотке крови является показателем, отражающим продукцию инсулина  $\beta$ -клетками островков Лангерганса и, следовательно, их функциональную активность. Так, при стаже диабета до 4 лет уровень базального С-пептида в сыворотке крови у пациентов с LADA соответствовал этому показателю при СД2 и, в тоже время, был выше, чем у больных СД1. Однако после 4 лет заболевания базальная концентрация С-пептида у пациентов с LADA сравнивалась с аналогичным показателем у пациентов с СД1, кроме того, отмечалась тенденция к более низкой базальной секреции С-пептида при LADA по сравнению с пациентами с СД 2 (рис. 5, рис. 6).

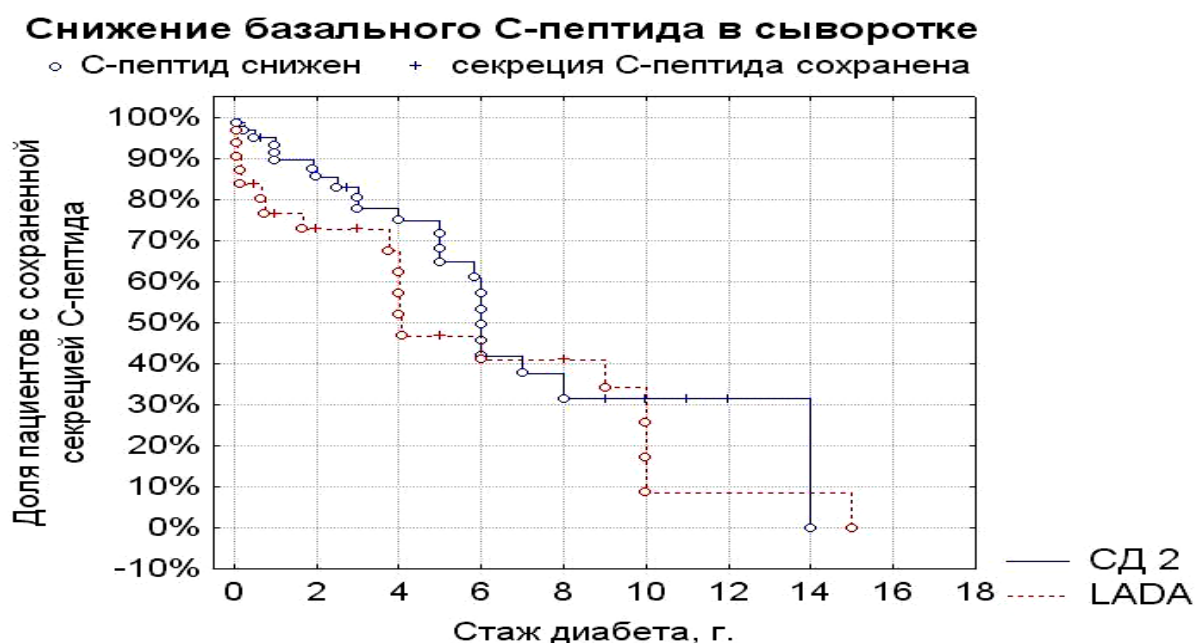


Рис. 6. Динамика концентрации С-пептида натощак в сыворотке крови у больных СД 2, LADA в зависимости от стажа заболевания

Базальная концентрация (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)) С-пептида при стаже заболевания менее 4-х лет у пациентов с СД1 составила 0,64 (0,28-0,78) нг/мл, у пациентов с LADA – 0,96 (0,86-2,31) нг/мл, а при СД2 – 1,54 (0,79-3,26) нг/мл (референтные значения у здоровых лиц согласно инструкции применяемой тест-системы «AccuBind», США – 0,7-1,9 нг/мл). В случае,

когда стаж диабета превышал 4 года, определялись следующие значения базальной концентрации С-пептида: СД1 – 0,24 (0,15-0,95) нг/мл, LADA – 0,31 (0,15-0,91) нг/мл, СД2 – 0,94 (0,28-2,39) нг/мл.

Данные наблюдения указывают на необходимость учета стажа заболевания в диапазонах до 4-х лет и 4-10 лет, так как продукция инсулина и функциональный резерв  $\beta$ -клеток относятся к факторам, способным оказывать влияние на изученные в работе иммунные показатели.

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

Таблица 5

Распространенность микроангиопатий (ретинопатия, нефропатия) у обследованных пациентов с сахарным диабетом

Показатели		СД 1 (n=37)	LADA (n=31)	СД 2 (n=67)
Без осложнений		48,7% (n=18)	38,8% (n=12)	26,9% (n=18)
Ретинопатия	непролиферативная	18,9% (n=7)	32,2% (n=10)	38,8% (n=26)
	пре- и пролиферативная	5,4% (n=2)	3,2% (n=1)	1,5% (n=1)
Нефропатия	стадия микроальбуминурии	24,3% (n=9)	19,3% (n=6)	31,3% (n=21)
	стадия протеинурии	2,7% (n=1)	6,5% (n=2)	1,5% (n=1)

Примечание: n – количество пациентов

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

Группу пациентов без микрососудистых осложнений с диагнозом СД1 составили 18 человек (11 мужчин, 7 женщин, средний возраст  $31,2 \pm 2,4$  г), 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  $46,5 \pm 3,0$  г). По факту наличия микрососудистых осложнений (как диабетической ретинопатии, так и нефропатии) в группу пациентов с СД1 вошли 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 микрососудистые осложнения наблюдались у 49 человек (20 мужчин, 29 женщин, средний возраст  $48,6 \pm 4,5$  лет).

В рассматриваемой выборке пациентов с СД1 стаж заболевания (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ )), при котором появлялись микрососудистые осложнения составил 8,0 (5,5-10,0) лет. При LADA развитие микроангиопатий происходило после 4-го года заболевания, т.е. в 2 раза раньше (табл. 6).

Таблица 6

Стаж сахарного диабета в зависимости от срока развития микроангиопатий  
(Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

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

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

Сопоставление данных о наличии микрососудистых осложнений и функциональном состоянии  $\beta$ -клеток поджелудочной железы подчеркивают, что падение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (как и при СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий (табл. 5).

Таблица 7

Базальная концентрация С-пептида у пациентов с сахарным диабетом в зависимости от наличия микроангиопатий (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

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

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

### 2.1.2. Клиническая характеристика и принципы стратификации пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Для решения поставленных в работе задач нами была сформирована выборка из 74 человек (из них 33 мужчины и 41 женщина, средний возраст  $42,2 \pm 1,4$  года) с тиреопатиями аутоиммунного генеза (рис. 6). Данные пациенты 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 –  $44,9 \pm 1,2$  года) с АИТ, вторую группу составили 45 пациентов (21 мужчин, 24 женщины, средний возраст –  $42,9 \pm 1,5$  года) с БГ. Группа больных АИТ в зависимости от функционального состояния ЩЖ была разделена на подгруппы пациентов в фазе эутиреоза (19 пациентов, из них 9 мужчины, 10 женщин, средний возраст  $42,3 \pm 1,3$  года) и в фазе гипотиреоза (10 пациентов, из них 3 мужчины, 7 женщин, средний возраст  $44,7 \pm 1,6$  года). Подобным

образом в группе пациентов с БГ были выделены 2 подгруппы: пациенты в фазе эутиреоза (14 человек, из них 4 мужчины и 10 женщин, средний возраст  $38,6 \pm 1,3$  года) и в фазе тиреотоксикоза (31 человек, из них 17 мужчин, 14 женщин, средний возраст  $43,8 \pm 1,2$  года). Стаж заболевания у больных АИТ составил  $7,5 \pm 5,0$  лет, у больных БГ –  $2,6 \pm 1,5$  года. Состояние эутиреоза у пациентов с АИТ было достигнуто путем приема L-тироксина, пациентам с БГ проводилось лечение препаратами тиреостатического ряда (мерказолил, тирозол).

Диагноз АИТ (шифр МКБ – E06.3) и БГ (шифр МКБ – E05.0) устанавливали на основании характерных клинико-лабораторных признаков. Диагноз АИТ верифицировался на основании клинической картины, данных физикального обследования, наличия характерных ультрасонографических признаков, обнаружения в сыворотке крови у больных повышенного титра антитиреоидных антител (антитела к тиреопероксидазе  $>30$  МЕ/мл и (или) тиреоглобулину  $>150$  МЕ/мл), а также при обнаружении вышеуказанных признаков и первичного гипотиреоза (повышенного уровня тиреотропного гормона (ТТГ) ( $>3,0$  мМЕ/л) в сочетании с нормальной или пониженной концентрацией свободных фракций трийодтиронина ( $T_3$ ) и тироксина ( $T_4$ ) (референтные значения для  $T_3$   $1,08-3,14$  пмоль/л;  $T_4$   $12,0-26,0$  пмоль/л).

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

### 2.1.3. Методы, используемые для стратификации клинических групп

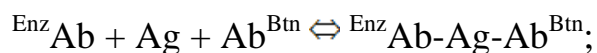
#### *Определение базального и стимулированного уровня С-пептида в сыворотке крови у пациентов с сахарным диабетом*

С целью оценки остаточной секреции эндогенного инсулина проводилось исследование содержания С-пептида в сыворотке крови у больных, полученной утром натощак и на 120-й мин теста толерантности к смешанной пище (ТТСП). ТТСП начинали до 10.00 натощак. В день проведения ТТСП введение утренней дозы инсулина короткого действия и пролонгированного инсулина откладывали до окончания пробы. Перед проведением теста определяли уровень глюкозы в крови: если содержание глюкозы превышало 11 мМоль/л или было ниже 4 мМоль/л, выполнение теста переносили на другой день. В ходе теста пациенту давали принять внутрь в течение 5 мин смесь для энтерального питания «Нутридринк» в количестве 6 мл на кг веса, но не более 360 мл. Забор венозной крови для определения уровня С-пептида осуществляли непосредственно перед и через 2 ч. (на 120 мин) после приема смеси [Greenbaum C. J., 2008].

Определение С-пептида проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («AccuBind», США).

Принцип идентификации С-пептида, используемый в тест системе «AccuBind», основан на одновременном двойном взаимодействии определяемого сывороточного антигена с избыточным количеством специфичных конъюгированных с ферментом (пероксидазой хрена) антител с одной стороны, и с избыточным количеством специфичных биотинилированных антител, с другой стороны, с образованием растворимого «сэндвичевого» комплекса.

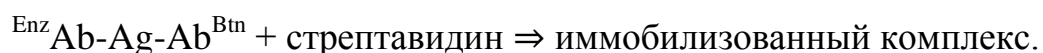
Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:





где  $Ab^{Btn}$  - биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество),  $Ag$  - определяемый антиген – С-пептид (переменное количество),  $^{Enz}Ab$  - фермент-меченые антитела (избыточное количество) и  $^{Enz}Ab-Ag-Ab^{Btn}$  – «сэндвичевый» комплекс антиген-антитело.

В процессе анализа происходит связывание биотинилированных антител комплекса с покрывающим поверхность ячеек стрептавидином. Эту реакцию иллюстрирует уравнение:



После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией и промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

В покрытые стрептавидином ячейки микропланшета A1–F1 вносили по 50 мкл стандартов с концентрацией от 0 до 10 нг/мл. В оставшиеся ячейки вносили по 50 мкл исследуемых образцов. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл трейсера, содержащего фермент-меченые аффинно очищенные мышинные моноклональные антитела к С-пептиду и биотинилированные моноклональные мышинные IgG к С-пептиду. После 2 ч инкубации при комнатной температуре удаляли жидкость из ячеек и проводили трёхкратную промывку промывочным буфером (по 300 мкл). Далее в каждую лунку вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора субстратного реагента (смесь раствора тетраметилбензидина и перекиси водорода в буфере). Через 15 мин инкубации в темноте добавляли по 50 мкл стоп-реагента (0,5 М серная кислота). Учет результатов иммуноферментного анализа производили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при

длине волны 405 нм. Концентрации С-пептида вычислялись по калибровочным кривым (рис. 7). Данные выражали в нг/мл.

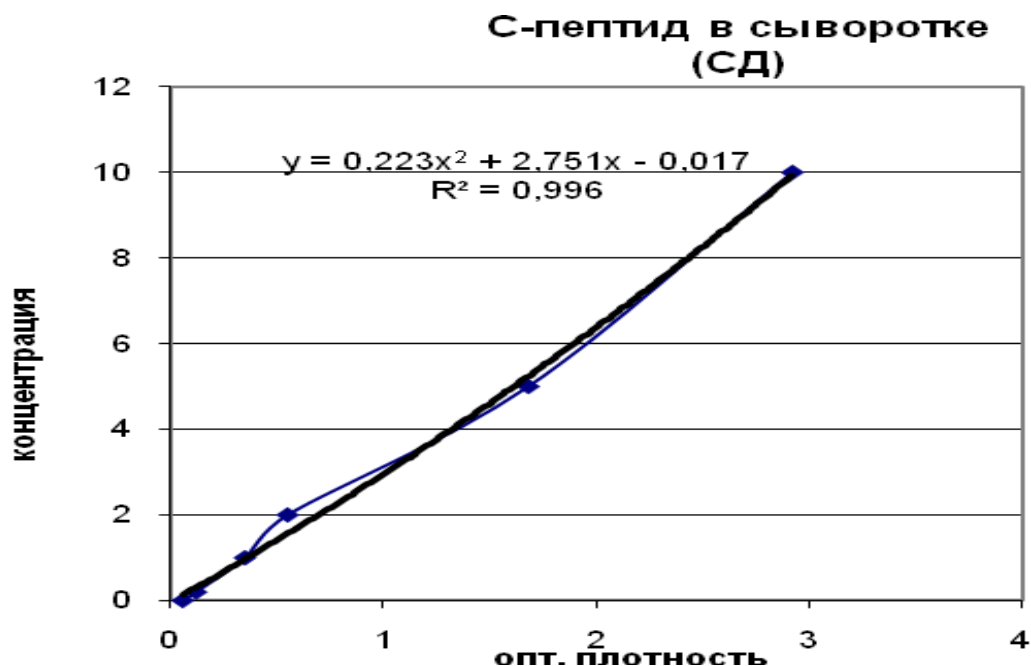


Рис. 7. Калибровочная кривая, построенная при определении С-пептида с помощью тест-системы «AccuBind»

### **Определение гликозилированного гемоглобина (HbA1c) у пациентов с сахарным диабетом**

С целью оценки степени компенсации углеводного обмена проводили определение содержания в крови гликогемоглобина A1c с помощью анализатора «Nycocard READER II» («AXIS-SHIELD plc», Великобритания). «Nycocard READER II» представляет собой рефлектометр, измеряющий интенсивность отраженного света в трех областях видимого спектра.

Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. В набор входит реакционная камера с пористым мембранным фильтром, тест-пробирки с реагентом и промывающий раствор. Реагент содержит вещество, лизирующее эритроциты и специфически преципитирующее гемоглобин, а также синий конъюгат борной кислоты, связывающий цис-диолы гликозилированного гемоглобина. При внесении образца в пробирку с

реагентом эритроциты лизируются, гемоглобин преципитирует. Конъюгат борной кислоты связывается с цис-диолами гликогемоглобина. Аликвота реакционной смеси вносится в рабочую ячейку реакционной камеры, при этом весь преципитировавший гемоглобин (связанный и несвязанный с конъюгатом) остается на поверхности фильтра. Избыток окрашенного конъюгата удаляется при промывке. Далее измеряется интенсивность синей окраски (гликогемоглобин) и красной окраски (общий гемоглобин) в рабочей ячейке реакционной камеры с использованием Nycocard Reader II, соотношение между ними пропорционально проценту HbA1c в образце. Разрешение метода - 0,1% HbA1c.

Перед началом работы проводили калибровку значения белого цвета. Затем вносили 5 мкл цельной крови в пробирку с реагентом и тщательно перемешивали. Спустя 2 мин, переносили 25 мкл реакционной смеси в рабочую ячейку реакционной камеры. Через 10 сек. промывали ячейку реакционной камеры 25 мкл промывающего раствора. Затем считывали результат с использованием «Nycocard READER II».

## **2.2. Иммунологические методы исследования**

### **2.2.1. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов крови**

Цельную венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) в объеме 50 мкл помещали в пробирку для проточной лазерной цитофлуориметрии. Добавляли 5 мкл меченных моноклональных антител к CD3+-, CD4+-, CD8+-, CD19+-, CD16/56<sup>low+</sup>-маркерам («BD Multitests 6 color TBNK», США), ресуспендировали с помощью вортекса и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. После этого в образцы добавляли 500 мкл лизирующего буфера («BD Biosciences», США), пробу ресуспендировали с помощью вортекса и инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре.

Измерения проводили на проточном цитометре FACS Canto II («Becton Dickinson», США) по оценке интенсивности свечения красителей с

помощью автоматического программного обеспечения FacsCanto II. При расчетах учитывались показатели малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, бокового светорассеяния (SSC), отражающего цитоплазматические и мембранные особенности клетки [Пинегин Б. В. и соавт., 2001]. Результаты выражали в процентах (%).

Также анализировали параметры полихромной (FITC, PE, PE-Cy7, APC) флюоресценции в гейте мононуклеарных клеток на проточном цитометре FacsCanto II («Becton Dickinson», США) и на ее основе определяли относительное количество клеток, несущих на своей поверхности маркеры активации (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+CD56+, CD19+) с автоматической фиксацией результатов (рис.8). Результаты также выражали в процентах (%).

Абсолютное и относительное содержание общего количества лимфоцитов, а также абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов определяли с помощью стандартных гематологических методов [Меньшиков В.В., 1987].

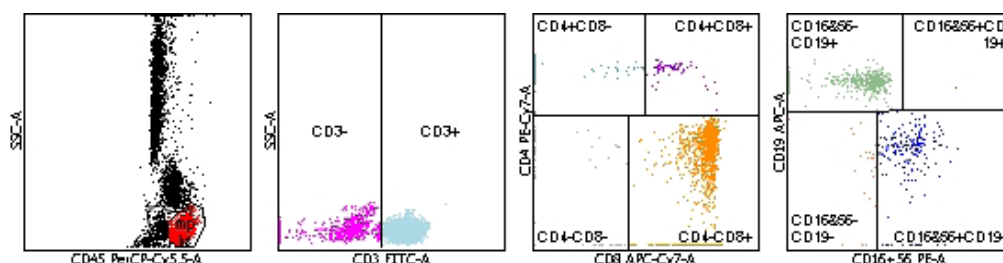


Рис. 8. Автоматическое исследование субпопуляционного состава лимфоцитов с помощью программы BD FACS Canto

### 2.2.2. Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови

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

Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) выдерживали при температуре 37°C в течение 40–60 мин для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности Ficoll-

Раке («Pharmacia», Швеция) ( $\rho=1,077\text{г/см}^3$ ) в соотношении 2:1 и центрифугировали при 400 g (1500 об/мин) в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо мононуклеарных лейкоцитов собирали в стерильную центрифужную пробирку. Дважды отмывали средой RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 400 g (1500 об/мин).

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

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

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

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

### **2.2.3. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови**

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

их осаждения. Полученный супернатант использовали для определения концентрации IL-2, TNF- $\alpha$  и IL-4.

#### **2.2.4. Методы оценки продукции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами *in vitro***

##### **2.2.4.1. Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ и TNF- $\alpha$ в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови**

Содержание цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) в супернатантах клеточных культур проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) наборами производства «ВекторБест» (Россия) согласно рекомендации производителями тест-системы.

В ячейки микропланшета A1-H1 вносили по 100 мкл разведений калибровочных растворов с известными концентрациями цитокинов (IL-2 – 0-500 пг/мл, IL-4 – 0-100 пг/мл, TNF- $\alpha$  – 0-250 пг/мл, IL-10 - 0-500 пг/мл., IFN- $\gamma$  - чувствительность набора - 5 пг/мл).

В оставшиеся ячейки вносили по 100 мкл исследуемых образцов. Через 2 ч инкубации при 37°C удаляли жидкость из ячеек, трижды промыв их буфером, после чего проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Далее в каждую лунку вносили необходимое для анализа количество конъюгата пероксидазы хрена с антивидовыми поликлональными антителами и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и непрерывном встряхивании. После трех циклов промывки и полной аспирации оставшейся в ячейках жидкости вносили во все лунки по 200 мкл раствора субстрата с красителем. Подготовленные пробы инкубировали 15 мин при 20°C в защищенном от прямых солнечных лучей месте на шейкере. Наблюдали развитие голубой окраски. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-реагента (0,5 М серная кислота) в каждую лунку.

Учет интенсивности окраски проводили с использованием фотометра для микропланшетов «Multiscan EX», («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  и TNF $\beta$  в культуральных средах рассчитывали по калибровочной кривой.

#### **2.2.4.2. Определение концентрации растворимого рецептора к TNF- $\alpha$ и sFas-L в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови**

Определение спонтанного и ФГА-стимулированного уровня растворимой формы Fas-лиганда (sFas-L) и содержания sTNF-R1 в супернатантах клеточных культур проводили с использованием твердофазного иммуноферментного метода по инструкциям, предлагаемым производителем («Bender MedSystems GmbH», Австрия). Процедуры ELISA при идентификации вышеназванных растворимых форм рецепторов существенно не отличались; в качестве примера приводим методику определения sTNF-R1.

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

Регистрацию результатов проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX», («ThermoLabSystems», Финляндия) по измерению оптической плотности образцов при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке Н1, в которой отсутствовал sTNF-R1. Концентрацию sTNF-R1 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов рассчитывали по калибровочной кривой.

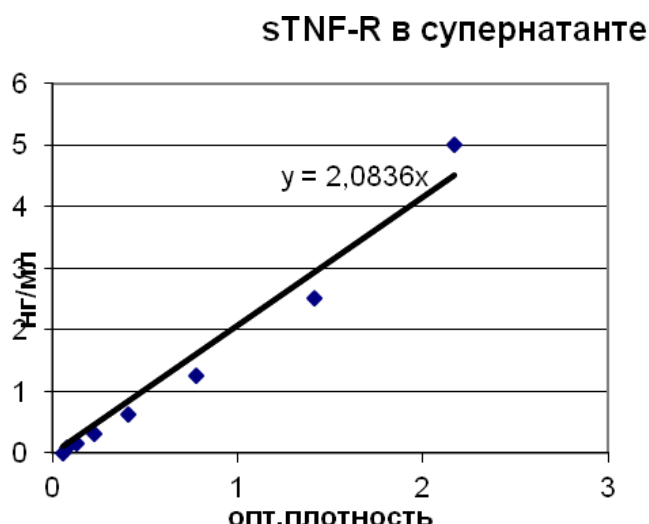


Рис. 9. Калибровочная кривая, построенная при определении sTNF-R1

Концентрацию sFas-L вычисляли путем удвоения значений, полученных по калибровочной кривой (рис. 5), поскольку образцы разбавляли, а растворы стандартов - нет. Данные выражали в нг/мл.

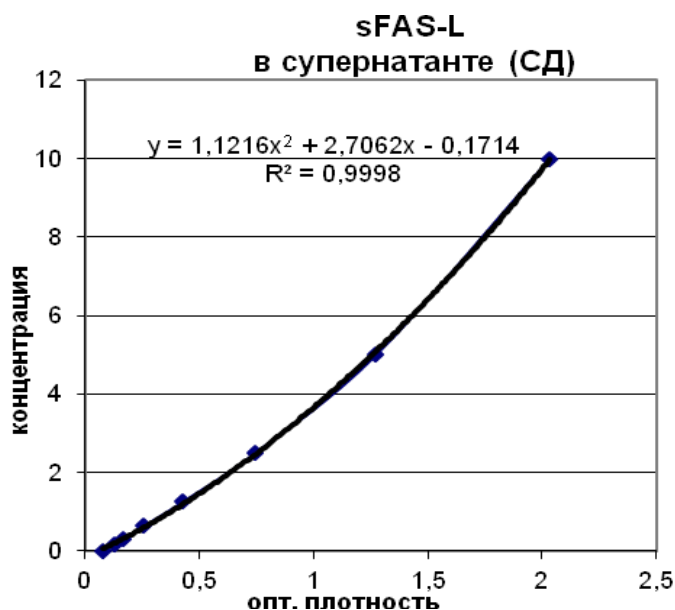


Рис. 10. Калибровочная кривая, построенная при определении sFas-L



### **2.2.4.3. Определение количества лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$**

В пробирки вносили 5 мкл фикоэритрин-меченных моноклональных антител к IL-2-рецептору (CD25-PE), IL-4-рецептору (CD124-PE) и TNF-R1 (CD120 $\alpha$ -PE) («Beckman Coulter», Франция), добавляли 50 мкл цельной венозной гепаринизированной (25 Ед/мл) крови и ресуспендировали с помощью вортекса. После 15 мин инкубации в темноте при комнатной температуре в пробы вносили 500 мкл лизирующего буфера («BD Biosciences», США), пробу ресуспендировали с помощью вортекса. После инкубации пробы центрифугировали 5 мин при 400 g (1500 об/мин), удаляли супернатант аспирацией и ресуспендировали образцы в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (pH=7,4).

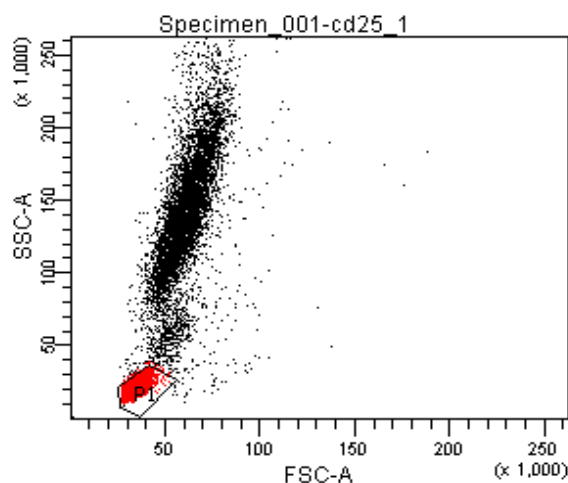
Анализировали параметры оранжевой ( $\lambda=585$  нм) флюоресценции в гейте мононуклеарных клеток на проточном цитометре FACS Canto II («Becton Dickinson», США) и на ее основе определяли относительное количество клеток, несущих на своей поверхности рецепторы к цитокинам IL-2, IL-4, TNF-R1. Результаты выражали в процентах (%).

### **2.2.4.4. Оценка количества лимфоцитов крови, несущих рецепторы цитокинов, CD95 (Fas) и Fas-L**

Метод основан на взаимодействии мембранной формы рецепторов цитокинов (CD 25 - IL-2R $\alpha$ ; CD120 $\alpha$  – TNF-R1; CD 124 - IL-4R $\alpha$ ; CDw210 – IL-10R; CD 212 - IL-12R), молекул Fas(CD95), CD4 $^{+}$  или CD8 $^{+}$  с моноклональными антителами, меченными фикоэритрином (PE). Для идентификации клеток, несущих Fas-L (CD178), использовались моноклональные антитела, меченные флюоресцин изотиоцианатом (FITC – 530 нм). Подготовка проб осуществлялась в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителями тест систем («Beckman Coulter», США и «Invitrogen», США).

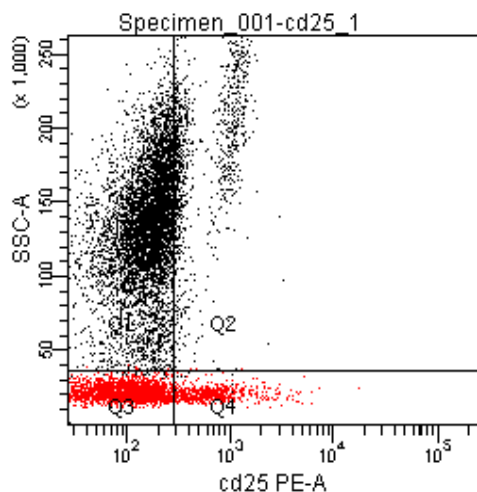
В каждую полистириновую пробирку с закругленным дном вносили 100 мкл цельной венозной гепаринизированной крови и 10 мкл соответствующих меченых моноклональных антител, тщательно перемешивая. После 20 мин инкубации при комнатной температуре в темном месте в каждую пробирку вносили по 1 мл приготовленного лизирующего буфера и тщательно перемешивали. Спустя 10 мин инкубации при комнатной температуре в темном месте центрифугировали 5 мин при 1500 тыс. об/мин и удаляли супернатант аспирацией. Затем клетки отмывали 3 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) («Helikon», США) в течение 5 мин при 1500 тыс. об/мин и удаляли супернатант аспирацией. Затем в каждую пробирку вносили по 0,5 мл PBS, ресуспендировали клетки и приступали к анализу на проточном цитометре.

Анализ образцов проводили на лазерном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II) с помощью программы BD FACSDiva («Becton, Dickinson and Co.», США). Сначала на основе определения малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, и бокового светорассеяния (SSC), определяющего цитоплазматические и мембранные особенности клетки, выделяли гейт лимфоцитов (рис. 7).



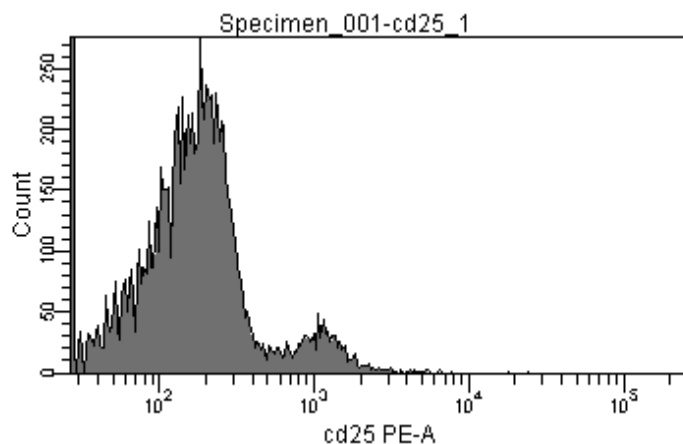
*Рис. 11. Выделение гейта лимфоцитов по сигналам бокового (SSC-A, ось ординат) и углового (FSC-A, ось абсцисс) светорассеяния*

Затем данную популяцию клеток анализировали на наличие флуоресценции по каналу фикоэритрина (рис. 8).



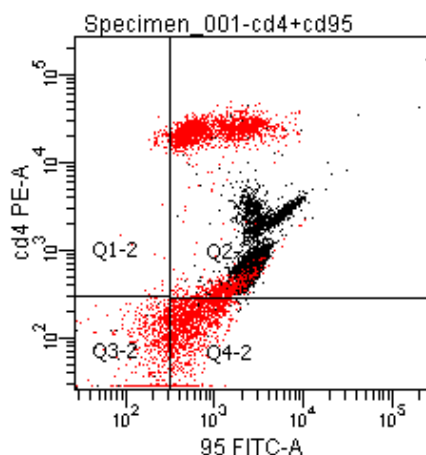
*Рис. 12. Идентификация лимфоцитов, меченных моноклональными антителами к CD 25, конъюгированными фикоэритрином*

Проекцию окна, выделяющего свечение в красной области спектра, выводили на экран в виде одномерной гистограммы (рис. 9).



*Рис. 13. Одномерная гистограмма распределения лимфоцитов по интенсивности флуоресценции (слева – несветящиеся клетки, справа – меченые PE лимфоциты)*

При исследовании присутствия Fas-лиганда (CD 178) на CD4+- и CD8+- лимфоцитах, клетки анализировали на наличие флуоресценции по двум цветам в различных координатах. Клетки, несущие Fas-L, идентифицировали по окрашиванию моноклональными антителами, меченными флюоресцин изотиоцианатом (рис. 10).



*Рис. 14. Идентификация CD4 лимфоцитов, на мембране которых присутствует Fas-L. По оси абсцисс – интенсивность зеленой флюоресценции (флюоресцин изотиоцианат), по оси ординат – интенсивность красной флюоресценции (фикоэритрин)*

Результаты исследования выражали в процентах. Использовалось автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением.

## **2.2.5. Оценка концентрации аутоантител к структурам поджелудочной и щитовидной железы**

### **2.2.5.1. Оценка концентрации аутоантител к структурам инсулярного аппарата поджелудочной железы**

#### ***Идентификация аутоантител к GAD65 в сыворотке крови***

Определение присутствия в сыворотке у больных аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD65) проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-системы («Biomerica», Германия). При внесении исследуемых сывороток высокоочищенный антиген GAD, адсорбированный на стенках лунок микропланшета, связывает определяемые антитела к GAD65. После промывки в лунки вносятся козы антитела к IgG человека, меченые ферментом (конъюгат), которые

связываются с иммобилизованным комплексом "антиген-антитело". Несвязавшийся конъюгат удаляется в результате второй промывки. Добавление субстрата приводит к развитию окраски, интенсивность которой измеряется спектрофотометрически. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации GAD65Ab в образце.

Предварительно было произведено разведение 10 мкл каждой сыворотки 1 мл рабочего раствора буфера для разведения проб. Затем в ячейки C1-H1 вносили в дублях по 100 мкл калибраторов, в ячейки A2 и B2 - по 100 мкл отрицательного и положительного контроля, соответственно. Лунки A1 и B1 оставлялись пустыми для бланка. В оставшиеся ячейки микропланшета вносили по 100 мкл разбавленных образцов сыворотки. После 1 ч. инкубации при комнатной температуре планшет трижды промывали 300 мкл промывочного буфера. Затем во все лунки, за исключением бланка (лунки A1 и B1), вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. После 1 часа инкубации в темноте планшет вновь трижды промывали 300 мкл промывочного буфера. Затем во все лунки, включая бланк (лунки A1 и B1), вносили по 100 мкл субстратного раствора. Далее планшет инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем для остановки реакции во все лунки планшета добавляли по 50 мкл стоп-раствора (1N NaOH). Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 405 нм против бланка (лунки A1 и B1). Концентрацию GAD65Ab вычисляли по калибровочной кривой. Положительный результат ( $>1,05$ ) означал присутствие антител в образце, отрицательный ( $<1,0$ ) - отсутствие антител в образце.

### ***Идентификация аутоантител к клеткам островков Лангерганса (ICA) в сыворотке крови***

Определение присутствия в сыворотке крови у больных аутоантител к клеткам островков Лангерганса (ICA) проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-системы («Biomerica», Германия). Принцип метода и процедура проведения анализа в точности соответствуют описанным выше для определения аутоантител к GAD65. Значения полученной оптической плотности сравнивали со средним значением референсного контроля (0,369).

### ***Идентификация аутоантител к инсулину (IAA) в сыворотке крови***

Определение присутствия в сыворотке крови у больных аутоантител к инсулину (IAA) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-системы («Orgentec», Германия). При внесении исследуемых сывороток в лунки микропланшета определяемые антитела связываются с адсорбированными на его стенках молекулами бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулинов. Несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляются промывкой. Связанные IAA пациента иммунологически выявляют путем добавления антител к IgG человека, конъюгированных пероксидазой хрена. Несвязавшийся конъюгат затем удаляется путем промывки. Субстрат фермента в присутствии связанного конъюгата гидролизуетсся с развитием голубой окраски. Эта реакция прерывается путем добавления кислоты, в результате образуется желтый конечный продукт. Интенсивность желтой окраски прямо пропорциональна концентрации IAA в образце.

Предварительно производилось разведение 10 мкл каждой сыворотки 990 мкл рабочего раствора буфера для разведения проб. Затем в ячейки A1-

H<sub>2</sub> вносили в дублях по 100 мкл калибраторов, отрицательного и положительного контроля. В оставшиеся ячейки микропланшета вносили по 100 мкл разбавленных образцов сыворотки. После 30 мин инкубации при комнатной температуре планшет трижды промыли 300 мкл промывочного буфера. Затем во все лунки помещали по 100 мкл конъюгата. После 15 мин инкубации планшет вновь трижды промывали 300 мкл промывочного буфера. Затем во все лунки вносили по 100 мкл раствора субстрата (тетраметилбензидин). Далее планшет инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем для остановки реакции во все лунки планшета добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Учет результатов иммуноферментного анализа производили спустя 5 мин с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрации IAA вычислялись по калибровочной кривой. Положительный результат (>8,0) означал присутствие антител в образце, отрицательный (<8,0) - отсутствие антител в образце.

#### **2.2.5.2. Оценка концентрации аутоантител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы**

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

При количественном определении антител к ТПО в лунки микропланшета (A1-H1) добавляли 100 мкл калибраторов (0-3000 МЕ/мл), положительного и отрицательного контрольного образца. В оставшиеся ячейки вносили 100 мкл образцов исследуемых сывороток крови, предварительно разбавленных в 100 раз буфером для разведения проб. Планшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре (20-28°C), после

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

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

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



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

### **2.2.6. Оценка экспрессии рецепторов к IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ фолликулярным эпителием щитовидной железы методом иммуногистохимии**

Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнялись на базе НОЦ «Инновационные технологии в морфологии» (заведующая – канд. мед. наук, доцент Дзюман А.Н.).

Иммуногистохимическое исследование операционного материала щитовидной железы осуществляли по методике Ю.А.Криволапова (Ю.А. Криволапов, Е.Е. Леенман. Морфологическая диагностика лимфом.- Спб.: «Издательскополиграфическая компания «Коста», 2006. - 208 с.). Фиксировали материал в 10 % забуференном (pH =7,4) растворе формалина, дегидратировали в IsoPrep (Biovitrum, Россия), затем заливали в парафин «Histomix» (Biovitrum, Россия). На микротоме Accu-Cut®SRM<sup>TM</sup>200b «Sakura» (Япония) изготавливали срезы толщиной 4 - 5 мкм и монтировали на предметные стекла с L-полилизинным покрытием (Menzel, Германия).

Депарафинизированные срезы проводили по трем порциям этанола (96°), промывали 5 мин в дистиллированной воде, помещали стекла со срезами в пластиковый держатель и погружали в 0,01 М цитратный буфер pH=6,0, после чего осуществляли высокотемпературную демаскировку антигенов в микроволновой печи (МВП).

Демаскировку проводили в два этапа. При мощности P=600Вт, в течение 1 мин, после остывания при открытой дверце – 7 мин при мощности P=400Вт (выходная мощность микроволновой печи 800 Вт). После демаскировки оставляли емкость со стеклами остывать при комнатной

температуре на 20 мин и промывали в двух порциях фосфатного буфера по 5 мин, наносили блокирующий эндогенную пероксидазу реагент (Peroxidase Blocking Reagent, Thermo Scientific, США) на 5 мин, после промывали в дистиллированной воде 5 мин, и в фосфатном буфере – 5 мин. Затем наносили на 5 минут блокирующую сыворотку (blocking serum, «NovoCastra», Великобритания) и промывали в 2-х сменах фосфатного буфера по 5 минут. Далее наносили первичные антитела и инкубировали срезы при температуре 25°C 60 мин. Первичные антитела предварительно разводили UltraAb Diluent Plus («Thermo Scientific», США). Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в табл. 8. После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере и наносили на срезы вторичные биотинилированные антитела на 30 мин, промывали в буфере и наносили стрептавидин-пероксидазный комплекс также на 30 минут, затем промывали в фосфатном буфере. Для выявления продуктов иммунной реакции на срезы наносили раствор диаминобензидина (DAB, «NovoCastra», Великобритания) на 5 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, проводили через этанол и ксилол, и заключали в канадский бальзам.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для оценки специфичности параллельно ставили реакцию без добавления первичных антител - «отрицательный» контроль.

Пропорция окрашенных клеток определялась на основе оценки всего предметного стекла и обозначалась: 0 (нет ни одной окрашенной клетки), 1 (1–30% окрашенных клеток), 2 (31–60% окрашенных клеток), 3 (61–100% окрашенных клеток). Окрашивание считалось недостоверным, если

количество окрашенных клеток соответствовало оценке от 0 до 1 баллов, и достоверно положительным, если диапазон был от 2 до 3 баллов.

Таблица 8

## Панель использованных в исследовании антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
первичные антитела				
IL-2R (CD25)	4C9	NovoCastra	1:200	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
IL-4R (CD124)	Поликлональные (Anti-IL-4R (CD124), cytoplasmic)	MilliPore	1:100	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
TNF-RI (CD120)	7C11	NovoCastra	1:100	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)
Вторичные антитела				
IG, SH X MS, BIOTIN-1MG (R)	Новолинк полимер	NovoCastra	1:100	10 мМ цитратный буфер (pH 6,0)-

Также было проведено стандартное гистологическое исследование. Пробоподготовка операционного материала щитовидной железы осуществлялась в соответствии с описанной ранее схемой.

Обзорную микроскопию осуществляли на микропрепаратах, окрашенных по стандартной методике гематоксилином Гарриса и эозином («Biovitrum», Россия) [Микроскопическая техника: Руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. - М.: Медицина, 1996.].

Для диагностики изменений в ЩЖ применялась схема оценки структуры органа, предусматривающая выделение 3 типов строения, предложенной [Пругло М.Ю., 2000; Хмельницкий О.К., 2002].

Первый тип строения – фолликулы имеют округлую или овальную форму, коллоид слабо эозинофильный, а эпителий фолликулов имеет кубическую или слабо уплощенную форму. Второй тип – характеризуется дезорганизацией фолликулов, которые принимают неправильную форму, эпителий в них несколько увеличен в объеме. Третий тип гистологического строения ЩЖ характеризовался сочетанием предыдущих двух вариантов.

При гистологических и иммуноморфологических исследованиях использовался полуколичественный метод оценки интенсивности соответствующей реакции, численности структур и выявленных клеточных элементов.

Для оценки клеточной инфильтрации использована шкала со значениями от 0 до 3+, в которой 0 – соответствовал отсутствию клеточных элементов; 1+-указывал на наличие единичных клеток или мелких групп клеток (от 5 до 10%); 2+-умеренное их содержание (от 10 до 20%); 3+-обилие клеточных элементов (от 20 до 40%).

При оценке фиброзных изменений использовалась упрощенная шкала: фиброз отсутствует, выражен слабо, умеренно, и хорошо выражен.

В некоторых случаях использовалась градация, отмечающая наличие или отсутствие признака, ее применяли для аденом, кист, появления кальцинатов в строме, плоскоклеточной метаплазии, наличия макрофагов. Принимая во внимание состояние паренхимы и мезенхимальных элементов, оценивались следующие признаки:

- Наличие и выраженность клеточной инфильтрации;
- Характер клеточной инфильтрации;
- Оценка локализации клеточной инфильтрации по отношению к эпителию, коллоиду, сосудам;

- Наличие лимфоидных фолликулов с оценкой степени размножения;
- Наличие макрофагов;
- Наличие плазмочитов;
- Наличие онкоцитов.

При оценке признаков выделены критерии гистологической оценки аутоиммунных процессов в ЩЖ, схема гистологической оценки представлена в табл. 9.

Для иллюстрации были использованы программы, отображающие накопленные в процессе работы фотоматериалы (графический редактор ImageJ).

Таблица 9

Характеристики, используемые для оценки гистологического строения образцов ткани щитовидной железы

<b>А-клеточная инфильтрация</b>		<b>Г-отношение инфильтрации к сосудам</b>	
0	Отсутствует	1	Не связана с сосудами
1	Мало, единичные клетки и группы клеток	2	Вокруг сосудов
2	Умеренно, единичные обширные скопления	<b>Д-Наличие лимфоидных фолликулов</b>	
3	много	0	Отсутствуют
<b>Б- Характер инфильтрации</b>		1	Мало
1	очаговая	2	Умеренно
2	диффузная	3	Много
<b>В-Наличие плазмочитов</b>		4	С герминативными центрами
0	Нет	5	Без герминативных центров
1	Единичные	<b>Е-Наличие макрофагов</b>	
2	Умеренно	0	Отсутствуют
3	Много	1	Имеются
4	Очень много		

### 2.2.7. Статистический анализ результатов исследования

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. Все количественные показатели проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. При соблюдении закона нормального распределения количественных признаков, результаты исследований представлялись в виде средней и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), при несоблюдении закона - рассчитывали медиану ( $Me$ ), интерквартильный размах ( $Q1-Q3$ ). Для оценки достоверности различий признаков, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Краскелла–Уоллиса (для нескольких независимых выборок). 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]. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное число и относительную величину в процентах. Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков в анализируемых группах проверяли с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса, а также использовался двусторонний вариант точного критерия Фишера с критическим уровнем значимости  $p < 0,05$  (при количестве наблюдаемых случаев в одной из выборок менее 5). Для выявления функциональных взаимосвязей между изученными параметрами проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Полученную корреляцию считали статистически значимой при  $p < 0,05$ . Анализ различия времени до наступления исхода проводился методом Каплана–Майера. Завершенными считали наблюдения, в которых изучаемый исход наступил на момент

обследования больного [Реброва О. Ю., 2002]. При сравнении применялся F-критерий Кокса. Сравнение многомерных группировок данных проводили с помощью дискриминантного анализа с использованием алгоритма пошагового отбора информативных признаков. Статистическую значимость полученных дискриминантных функций оценивали с помощью  $\lambda$ -критерия Уилкса. Качество дискриминации проверяли по таблице классификации, отображающей результаты отдельных данных в сравниваемых группах на основе дискриминантных функций. Распределение групп по анализируемым признакам проводили с учетом значений координат центроидов на канонических осях [Афифи А., Эйзен С., 1982]. При проведении расчетов использовался пакет прикладных программ SPSS 11.5.

### **Глава 3. КЛИНИЧЕСКИЕ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

#### **3.1. Клинические особенности манифестного и латентного аутоиммунного сахарного диабета**

В 1986 году впервые сообщили о подгруппе пациентов с СД 2 типа, у которых, несмотря на присутствие аутоантител к островковой ткани сохранялась собственная секреция инсулина [Groop LC и др., 1986]. Данная группа пациентов явно отличалась от классических вариантов сахарного диабета 1 и 2 типа. Позже, Tuomi и соавт., [1993] и Zimmet и соавт., [1994] инициировали распространение эпонима LADA– latent autoimmune diabetes in adult (латентный аутоиммунный диабет у взрослых). Согласно их определению, LADA - медленно прогрессирующая форма аутоиммунного диабета, первоначально управляемая с помощью диеты и пероральных сахароснижающих средств, прежде чем стать инсулинозависимой. С тех пор стало ясно, что латентный аутоиммунный диабет [Molbak AG и соавт., 1994] достаточно часто встречается у пациентов старше 30 лет.

Интересно, что общепринятого определения LADA не существует до сих пор, что, конечно, влияет на подходы к эпидемиологическим исследованиям данного варианта СД. Согласно некоторым из них, LADA – это эпоним, описывающий группу пациентов с СД 2 типа и определяемыми антителами к островковым клеткам и медленно прогрессирующей в-клеточной недостаточностью. Если опираться на это определение, то распространенность LADA примерно 10% среди пациентов с СД2 в возрасте 40-75 лет [Gunnar Stenstrom, 2005; Wroblewski M, 1998]. Аналогичная частота LADA регистрировалась у пациентов старше 35 лет с клиническим фенотипом СД2 и в другом исследовании [TuomiT, 1999], и среди пациентов с СД2 всех возрастных групп - в известном исследовании UKPDS [Turner R, 1997]. Однако среди пациентов с СД2 моложе 35 лет LADA регистрируется гораздо чаще – в 25% случаев [Landin-Olsson M, 1992; Borg



Н, 2003]. Распространенность LADA варьируется в достаточно широком диапазоне, минимальные и максимальные частоты соответствуют странам с аналогичной распространенностью классического СД1, что является одним из доказательств тождественности механизмов развития данных вариантов СД (табл. 10).

Согласно диагностическим критериям, используемым Immunology and Diabetes Society, для LADA характерна манифестация в возрасте старше 30 лет и отсутствие абсолютной инсулиновой недостаточности в последующие 6 месяцев [Furlanos S., 2005; Maioli M., 2006; Palmer J. P., 2005]. С другой стороны, LADA чаще, чем СД2, манифестирует в возрасте моложе 50 лет. Дебют LADA сходен с СД2 - начало заболевания без кетоацидоза и выраженной потери массы тела [Juneja R., 2001]. Согласно данным ряда авторов, пациенты с LADA составляют не менее 50% пациентов с клиническим фенотипом СД2 без избыточной массы тела [Kobayashi T., 1993]. У пациентов с LADA достоверно реже встречается ожирение (индекс массы тела обычно менее  $25 \text{ кг/м}^2$ ) и чаще встречаются аутоиммунные заболевания в личном и семейном анамнезе. Эти признаки могут быть использованы в качестве клинических критериев для скрининга LADA [Furlanos S., 2006]. Тем не менее, очень важно отметить, что наличие ожирения у пациента не исключает LADA. А также общепринято, что на основании только клинически признаков (ИМТ, возраст, особенности клинической картины) без определения позитивного титра аутоантител, нельзя достоверно верифицировать LADA [Gottsater A, 1994; Juneja R, 2001].

Таблица 10

Распространенность LADA, установленная по частоте встречаемости пациентов с присутствием в сыворотке крови антител к GAD (по данным [Pozzilli P., Di Mario U. 2001] с дополнениями)

Ссылка, страна	Тип исследования	Возраст, стаж СД, число обследованных лиц	Другие критерии	Частота пациентов с присутствием в сыворотке крови антител к GAD
[Bruno G., 1999], Италия	Популяционное	30-54 лет, дебют СД, n=130	ИМТ<25	22,3%
[Bosi E. P., 1999], Италия	Популяционное	>40 лет, n=2.076	ПГТТ	2,8%; НТГ - 0,6%
[Tuomi T., 1999], Финляндия	Популяционное	28-83, фенотип СД2 n=1.122		9,3%; среди пациентов моложе 45 лет – 19,3%, среди пациентов старше 45 лет – 8,2%
[Wroblewski M., 1998], Швеция	Направление в клинику	40-75, дебют СД n=203		8%, среди пациентов с клиническим фенотипом СД2 - 3,2%
[Turner R., 1997], Соединенное Королевство	Репрезентативная популяция	25-65, дебют СД2 n=3.672	Европейцы	10%, среди пациентов 25-34 лет – 34%,

				среди пациентов 55-65 лет – 7%
[Ruige J.B., 1997], Нидерланды	Выборочная группа населения	50-74 n=2.350	GAD Ab+ если титр выше 99-й перцентили общей популяции	При установленном диагнозе СД - 3,5% (ДИ 0,7-10,0%), при первичном скрининге СД – 0% (ДИ 0-3,3%)
[Niskanen L.K., Tuomi T., 1995], Финляндия	Направление от врачей общей практики	45-64 лет, дебют СД2 n=133	ПГТТ	9%
[Кононенко И.В., 2005], Россия	Выборка	30-64 лет, фенотип СД2 стаж 6 мес. – 5 лет, n=93		30,1%

Примечание: ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест, ИМТ – индекс массы тела, НТГ – нарушение толерантности к глюкозе, ДИ – доверительный интервал

В ходе инициированного нами исследования были получены клинические данные, характеризующие особенности течения заболевания у пациентов с различными вариантами аутоиммунного сахарного диабета (с манифестным началом, LADA). Группой сравнения служила группа пациентов с СД2. Принципы формирования клинических групп описаны в главе 2. Клиническая характеристика обследованных групп пациентов приведена в табл. 11,12.

Таблица 11

Распределение пациентов в зависимости от стажа сахарного диабета

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

Достоверных различий между группами по стажу СД выявлено не было ( $p>0,05$ ) (табл. 11). Распределение больных по полу в группе больных LADA и СД2 было примерно одинаковым. Обращало на себя внимание превалирование женщин среди пациентов с LADA, что отличало эту группу от СД1 ( $p=0,05$ ) (табл. 12).

Анализируя распределение пациентов по возрасту в обследованных группах, можно утверждать, что пациенты с LADA были достоверно моложе пациентов с СД2 ( $p=0,008$ ), но старше, чем больные с СД1 ( $p<0,001$ ) (табл. 12), это отражает характер заболеваемости этими вариантами СД, учитывая примерно одинаковое распределение пациентов всех клинических групп по стажу заболевания.

Масса тела пациентов с LADA достоверно не отличалась от больных с СД1 и была меньше, чем у пациентов с СД2 ( $p=0,002$ ). Аналогичные различия между группами прослеживались и при анализе ИМТ ( $p<0,001$ ), а также ОТ ( $p<0,001$ ) (табл. 12).

Таблица 12

## Клиническая характеристика пациентов с сахарным диабетом

Показатели	LADA	СД1	СД2
Количество обследованных лиц	31 (23%)	37 (27,4%)	67 (49,6%)
из них, мужчин	12 (38,7%)	24 (64,9%) $p_1=0,05$	27 (40,3%) $p_1>0,05$ ; <b><math>p_2=0,02</math></b>
Возраст, лет	41,4 ± 11,6	30,5 ± 7,2 <b><math>p_1&lt;0,001</math></b>	46,8 ± 9,0 <b><math>p_1=0,008</math>;</b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Вес, кг	72,7±20,3	70,5±16,0 $p_1>0,05$	85,0±18,2 <b><math>p_1=0,002</math>;</b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	25,3±4,9	23,6±4,6 $p_1>0,05$	30,6±6,0 <b><math>p_1&lt;0,001</math>;</b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Окружность талии, см	73,0 [69,0; 78,0]	70,0 [68,0; 74,0] $p_1>0,05$	89,0 [78,0; 99,5] <b><math>p_1&lt;0,001</math>;</b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Стаж СД, лет	3,0 [0,7; 6,0]	4,0 [1,1; 6,0] $p_1>0,05$	2,5 [1,0; 5,8] $p_1>0,05$ ; $p_2>0,05$
Возраст дебюта, лет	37,5±10,0	25,6±7,8 <b><math>p_1&lt;0,001</math></b>	43,3±8,7 <b><math>p_1=0,003</math>;</b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Продолжительность инсулинотерапии, годы	0,6 [0,1; 4,0]	4,0 [1,1; 6,0] <b><math>p_1=0,03</math></b>	0,8 [0,1; 2,0] $p_1>0,05$ ; <b><math>p_2=0,01</math></b>
Суточная доза инсулина, ЕД/кг	0,46±0,21	0,59±0,18 <b><math>p_1=0,03</math></b>	0,51±0,18 $p_1>0,05$ ; $p_2>0,05$
HbA1c, %.	8,6±3,2	8,4±2,3 $p_1>0,05$	8,4±2,2 $p_1>0,05$ ; $p_2>0,05$

Примечание:  $M \pm SD$  либо  $Me [Q1-Q3]$ ,  $p_1$  - уровень статистической значимости отличия значений показателей по сравнению с таковыми у больных LADA;  $p_2$  - у пациентов с СД1

При анализе возраста дебюта заболевания были получены достоверные различия между обследованными группами. Наиболее молодой возраст дебюта регистрировался при СД1, затем LADA, и наиболее старший возраст дебюта отмечался при СД2 (табл. 12).

У обследованных пациентов отмечалась прямая корреляционная связь возраста дебюта заболевания и таких показателей, как окружность талии ( $r=0,36$ ,  $p<0,001$ ) и индекс массы тела (ИМТ) ( $r=0,32$ ,  $p<0,001$ ), что отражает большее число пациентов с СД2 и метаболическим синдромом среди лиц с более поздней манифестацией заболевания.

Анализ структуры заболеваемости в зависимости от возраста манифестации диабета показал, что при дебюте заболевания в возрасте до 30 лет превалировал СД1, несколько реже встречался LADA, а СД2 регистрировался в единичных случаях. В интервале от 30 до 50 лет чаще встречался СД2, несколько реже манифестировал LADA, однако, заболеваемость СД1 еще сохранялась на достаточно высоком уровне. В возрасте старше 50 лет основная доля заболевших приходилась на пациентов с СД2, тем не менее в 10% случаев диагностировался LADA, а случаев заболеваемости СД1 среди пациентов с дебютом заболевания старше 50 лет зарегистрировано не было (рис. 15).

Заболеваемость LADA во всех возрастных группах была сопоставимой ( $p>0,05$ ). СД1 манифестировал достоверно чаще в возрасте до 30 лет ( $p<0,001$ ). Напротив, СД2 достоверно чаще манифестировал в старшей возрастной группе как по сравнению с группой с дебютом заболевания в возрасте от 30 до 50 лет ( $p=0,03$ ), совсем не встречался у пациентов моложе 30 лет по данным нашей выборки ( $p<0,001$ )(рис. 15).

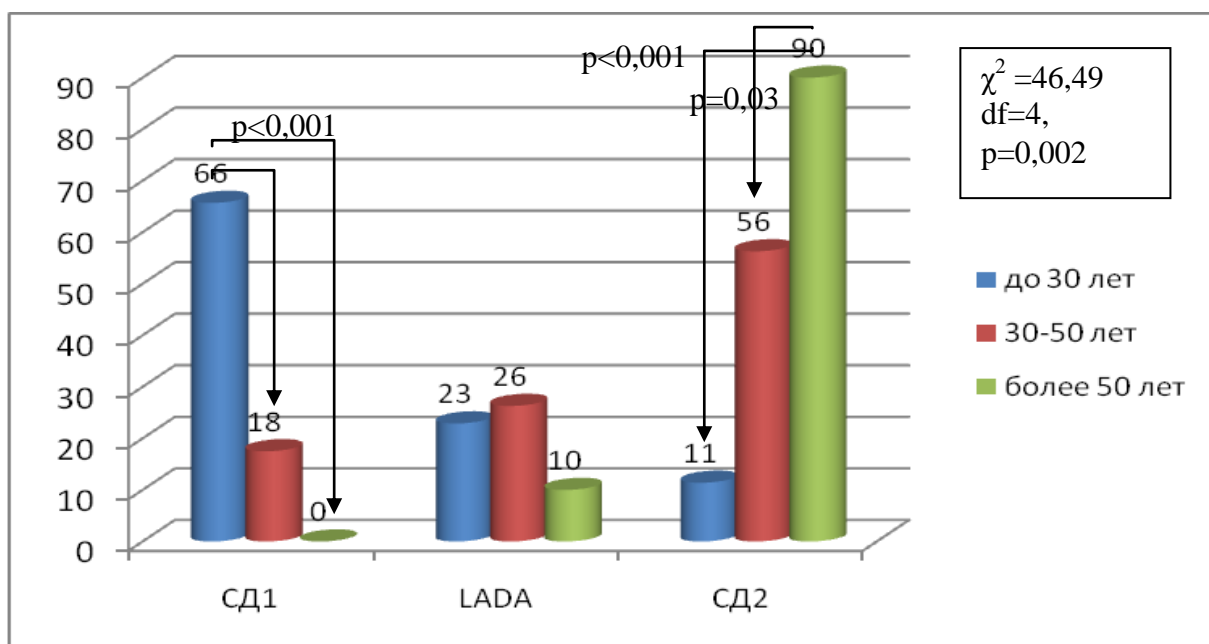


Рис. 15. Распределение пациентов в зависимости от типа диабета и возраста дебюта (%).

$p$ -уровень статистической значимости различий (по данным двухстороннего точного критерия Фишера).

При анализе распространенности сосудистых осложнений СД в обследованных группах было установлено, микрососудистые осложнения встречались в обследованных группах примерно с одинаковой частотой. Анализ времени до развития нефропатии либо ретинопатии (при их отдельном подсчете) не выявил достоверных различий между обследованными группами пациентов. Ретинопатия отмечалась у 34,8% больных СД в общей выборке, причем тяжелая ретинопатия (пре- и пролиферативная) - у 3,0%. При СД2 частота ретинопатии составила 40,3%, в том числе тяжелой ретинопатии – 1,5%. При LADA – поражение сетчатки было выявлено у 35,5%, в т.ч. тяжелой ретинопатии – у 3,2% больных (табл. 13).

Нефропатия была установлена в среднем у 29,6% больных СД по всем трем группам (СД1, СД2 и LADA), в том числе в стадии протеинурии - у 3,0%. При СД2 частота нефропатии составила 32,8%, а при LADA – 25,8% (табл. 13).

Таблица 13

Поздние осложнения сахарного диабета, ассоциированные состояния и показатели тиреоидного профиля у пациентов с сахарным диабетом

Показатели		LADA n=31	СД1 n=37	СД2 n=67
Ретинопатия	всего	35,5% (11)	24,3% (9) $p_1=0,42$	40,3% (27) $p_1=0,82$ $p_2=0,13$
	Пре- и пролиферативная	3,2% (1)	5,4% (2) $p_1=1,00$	1,5% (1) $p_1=0,53$ $p_2=0,29$
Нефропатия	всего	25,8% (8)	27,0% (10) $p_1=1,00$	32,8% (22) $p_1=0,64$ $p_2=0,45$
	Стадия протеинурии	6,5% (2)	2,7% (1) $p_1=0,59$	1,5% (1) $p_1=0,23$ $p_2=1,00$
Артериальная гипертензия		29,0% (9)	10,8% (4) $p_1=0,07$	55,2% (37) $p_1=0,02$ $p_2<0,001$
Аутоиммунный тиреоидит		32,3% (10)	5,4% (2) $p_1=0,008$	10,4% (7) $p_1=0,01$ $p_2=0,49$
Показатели тиреоидного профиля (M±SD)				
ТТГ, мМЕ/л		2,34±1,2	2,90±0,8 $p_1=0,42$	3,5±1,0 $p_1=0,23$ $p_2=0,9$
св. Т4, пмоль/л		14,54±2,2	15,32±1,7 $p_1=0,7$	13,02±2,9 $p_1=0,9$ $p_2=0,9$
св. Т3, пмоль/л		3,47±0,3	4,64±0,6 $p_1=0,6$	3,97±0,6 $p_1=1,00$ $p_2=0,76$
АТ к ТПО, МЕ/л		112±36	57±12 $p_1=0,08$	69±23 $p_1=0,16$ $p_2=1,00$

Примечание:  $p_1$  - уровень статистической значимости отличия частоты от таковой в группе больных LADA,  $p_2$  – в группе пациентов с СД1



Артериальная гипертензия встречалась у 37,0% пациентов с СД в общей выборке. При LADA частота выявления артериальной гипертензии составила 29,0%, а при СД2 – 55,2% ( $p=0,02$ ) (табл. 13).

После стратификации клинических групп по признаку – наличие/отсутствие любого микрососудистого осложнения СД (ретинопатия, нефропатия) были получены отличающиеся от предыдущего анализа данные (табл.14).

В рассматриваемой выборке пациентов с СД1 стаж заболевания (Me ( $Q_1-Q_3$ )), при котором появлялись микрососудистые осложнения составил 8,0 (5,5-10,0) лет. При LADA развитие микроангиопатий происходило после 4-го года заболевания, т.е. в 2 раза быстрее (табл. 14).

Таблица 14

Продолжительность течения сахарного диабета в зависимости от срока развития микроангиопатий (Me ( $Q_1-Q_3$ ))

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

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

Сопоставление данных о наличии микрососудистых осложнений и функциональном состоянии  $\beta$ -клеток поджелудочной железы подчеркивают, что падение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (как и при СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий (табл. 15).

Таблица 15

Базальная концентрация С-пептида у пациентов с сахарным диабетом в зависимости от наличия микроангиопатий (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

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

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

Предположение о том, что LADA может быть компонентом аутоиммунного синдрома, подтверждается фактом обнаружения аутоантител к тиреоидному эпителию, а также антиадреналовых и глиадиновых антител в гораздо большем проценте случаев, чем при классическом СД2 [Falorni A., Gambelunghe G, 2000; Kukreja A., Cost G., Marker J., 2002]. Однако в большинстве исследований обнаружение более частой встречаемости органоспецифических аутоантител, кроме островковых, и при классическом СД1, не позволяет их дифференцировать по данному принципу. Так, частота носительства антитиреоидных антител (АТ-ТПО, АТ-ТГ) среди взрослых женщин с СД1 достигает 31,4% [Perros P, 1993], у взрослых пациентов с СД2 и позитивных по GAD-Ab – до 24% [Gambelunghe G, 2000], и даже в педиатрической популяции у лиц с классическим СД1 от 20% [Kordonouri O, 2009] до 39% и с фенотипом LADA – 32% [Libman IM, 2008; Murao S., 2008].

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

к ткани щитовидной железы и ультразвуковые признаки ее аутоиммунной патологии (Клинические рекомендации Российской Ассоциации Эндокринологов по диагностике и лечению аутоиммунного тиреоидита у взрослых, 2002). При СД2 частота его обнаружения составила 10,4%, а при LADA – 32,3% ( $p=0,02$ ). Обращал на себя внимание тот факт, что в нашей выборке у пациентов с LADA аутоиммунный тиреоидит регистрировался достоверно чаще, по сравнению как с СД2, так и с СД1 (табл. 13). На момент обследования пациенты всех клинических групп находились в состоянии спонтанного или медикаментозного (пациенты с ранее диагностированным АИТ) эутиреоза, по показателям гормонального фона статистически значимых различий получено не было (табл. 13).

Носительство АТ-ТПО – частое явление при аутоиммунных расстройствах, не связанных с ЩЖ (при болезни Аддисона более 50%, при ревматоидном артрите – 30%, синдроме Шегрена – 17–40%, системной красной волчанке – 23%, склеродермии – 19%, фибромиалгии – 24% и др.). Однако эти данные были получены не в популяционных проспективных исследованиях, проясняющих риск развития этих заболеваний у лиц с АТ-ТПО, и для оценки риска развития дисфункции ЩЖ у лиц с АТ-ТПО при наличии у них другого аутоиммунного заболевания. Исключение составляет сахарный диабет 1-го типа: в последнем большом проспективном исследовании, посвященном данной проблеме, выявлено, что кумулятивная распространенность АИТ при длительности диабета свыше 10 лет составляет 14%, и показано, что при повышенном уровне аутоантител у большинства пациентов в течение последующих пяти лет развивается гипотиреоз [Волкова Н.И., 2006].

### **3.2. Особенности нарушения метаболизма у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

Уровень гликированного гемоглобина оценивался после включения пациентов в исследование до коррекции терапии. По уровню

гликированного гемоглобина A1c пациенты с LADA ( $8,6 \pm 0,8\%$ ) не отличались достоверно как от больных с СД2 ( $8,4 \pm 0,4\%$ ), так и от пациентов с СД1 ( $8,4 \pm 0,5\%$ ) (табл.16). Оценка компенсации углеводного обмена оценивалась по достижению уровня HbA1c (согласно критериям ADA): HbA1c < 7,0% - компенсация; 7,0-7,5%-субкомпенсация; > 7,5%-декомпенсация. По распределению пациентов в зависимости от уровня компенсации углеводного обмена, обследованные группы достоверно не различались (табл. 16).

Клинические исходы у пациентов LADA определяются как наличием инсулинорезистентности (как у пациентов с СД 2 типа), так и аутоиммунной деструкцией  $\beta$ -клеток (как у пациентов с СД 1 типа). Гипотеза «акселератора» предполагает, при СД 1 типа и СД 2 типа имеются сходные механизмы повреждения  $\beta$ -клеток, индуцированного гипергликемией, но у сахарного диабета 1 типа к этому добавляются аутоиммунные патогенетические черты.

Таблица 16

Распределение пациентов обследованных групп в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена

Состояние углеводного обмена	LADA	СД1	СД2	p
Компенсация	22,6%	24,3%	19,4%	p>0,05
Субкомпенсация	6,5%	5,4%	13,4%	p>0,05
Декомпенсация	71,0%	70,2%	67,2%	p>0,05

В соответствии с задачами исследования были оценены показатели липидного обмена в обследованных группах. Значения уровня общего холестерина у пациентов с LADA не отличались от таковых у больных СД1 и были достоверно ниже, чем при СД2 (табл. 17). Эти различия указывают на значимость инсулинорезистентности и метаболического синдрома для формирования гиперхолестеринемии, несмотря на сходное состояние углеводного обмена, а также необходимо учитывать превалирование в

группе пациентов с СД2 лиц более старшего возраста, чем в группе с LADA, и тем более в группе пациентов с СД1. Содержание общего холестерина прямо коррелировало с возрастом пациентов ( $r=0,30$ ,  $p=0,003$ ), ИМТ ( $r=0,48$ ,  $p<0,001$ ), ОТ ( $r=0,43$ ,  $p<0,001$ ), возрастом дебюта заболевания ( $r=0,29$ ,  $p=0,004$ ), уровнем ТГ ( $r=0,72$ ,  $p<0,001$ ), базальной ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ) и стимулированной секрецией С-пептида ( $r=0,38$ ,  $p=0,013$ ). Отмечена отрицательная корреляция уровня общего холестерина и концентрации аутоантител к поверхностному антигену  $\beta$ -клетки (ICA) ( $r=-0,28$ ,  $p=0,047$ ).

Таблица 17

Характеристика показателей липидного обмена у пациентов с сахарным диабетом, (Me (Q1-Q3))

Показатели	LADA n = 31	СД1 n = 37	СД2 n = 67
Общий холестерин, ммоль/л	5,3 $\pm$ 1,1	5,1 $\pm$ 1,1 $p_1=0,56$	6,2 $\pm$ 1,7 <b><math>p_1=0,03</math></b> <b><math>p_2=0,02</math></b>
Триглицериды, ммоль/л	1,7 (0,9 - 3,0)	1,0 (0,7 - 1,5) $p_1=0,12$	1,8 (1,1 - 2,7) $p_1=1,00$ <b><math>p_2=0,02</math></b>
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	3,4 $\pm$ 0,9	3,5 $\pm$ 1,0 $p_1>0,05$	4,0 $\pm$ 1,4 $p_1>0,05$ $p_2>0,05$
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,3 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4 $p_1>0,05$	1,1 $\pm$ 0,3 $p_1>0,05$ $p_2>0,05$
Холестерин ЛПОНП, ммоль/л	0,8 (0,4- 1,4)	0,4 (0,3 - 0,7) $p_1=0,07$	0,8 (0,5 - 1,2) $p_1=1,00$ <b><math>p_2=0,02</math></b>
Коэффициент атерогенности	3,7 $\pm$ 1,3	3,0 $\pm$ 1,2 $p_1=0,31$	5,1 $\pm$ 2,3 $p_1=0,05$ <b><math>p_2=0,01</math></b>

(продолжение табл. 17)			
Базальная концентрация С-пептида в сыворотке у больных сахарным диабетом			
Базальный С-пептид, нг/мл	0,8 (0,4 - 1,4)	0,46 (0,22 - 0,83) $p_1=0,20$	1,32 (0,58 - 2,98) $p_1=0,28$ <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Базальный С-пептид, стаж диабета до 4 лет	0,96 (0,86 - 2,31)	0,64 (0,28 - 0,78) <b><math>p_1=0,026</math></b>	1,54 (0,79 - 3,26) $p_1=1,0$ <b><math>p_2=0,001</math></b>
Базальный С-пептид, стаж диабета 4 года и более	0,31 (0,15 - 0,91)	0,24 (0,15 - 0,95) $p_1=1,0$	0,94 (0,28 - 2,39) $p_1=0,14$ ; $p_2=0,1$
Базальный С-пептид < 1,0 нг/мл	61,3%	78,4% <b><math>p_1=0,047</math></b>	35,8% <b><math>p_1=0,02</math></b> <b><math>p_2&lt;0,001</math></b>
Базальный С-пептид > 3,0 нг/мл	9,7 %	2,7% $p_1=0,34$	25,4% $p_1=0,10$ <b><math>p_2=0,005</math></b>
Концентрация С-пептида в сыворотке на 120-й мин ТТСП при сахарном диабете			
С-пептид на 120 мин ТТСП, нг/мл	0,79 (0,45 - 1,97)	0,38 (0,21 - 1,11) $p_1=0,93$	2,80 (1,52 - 4,50) <b><math>p_1=0,017</math></b> <b><math>p_2=0,002</math></b>
С-пептид на 120 мин ТТСП, стаж диабета до 4 л	1,30 (0,65 - 2,99)	0,66 (0,20 - 1,14) $p_1=0,24$	2,32 (0,79 - 4,50) $p_1=0,92$ <b><math>p_2=0,02</math></b>
С-пептид на 120 мин ТТСП, стаж диабета 4 г и более	0,19 (0,17 - 0,52)	0,26 (0,21 - 0,73) $p_1=1,00$	4,24 (2,76 - 5,46) <b><math>p_1=0,016</math></b> $p_2=0,47$

По уровню триглицеридов и холестерина ЛПОНП группа больных с LADA была близка к пациентам с СД2, различия между которыми и группой пациентов с СД1 были статистически значимы (табл. 17). Уровень

триглицеридов прямо коррелировал с ИМТ ( $r=0,32$ ,  $p=0,010$ ), ОТ ( $r=0,50$ ,  $p<0,001$ ), базальной секрецией С-пептида ( $r=0,30$ ,  $p=0,018$ ).

Достоверных различий между группами по содержанию холестерина ЛПНП получено не было. Отмечалась тенденция к более высоким значениям холестерина ЛПНП в сыворотке крови у больных СД2, что указывает на наличие у последних метаболического синдрома, одним из компонентов которого является атерогенная дислипидемия.

Коэффициент атерогенности у пациентов с LADA и СД1 был достоверно ниже, чем у больных с СД2 (табл. 16). Данный показатель в общей выборке пациентов с СД прямо коррелировал с возрастом пациентов ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ), ИМТ ( $r=0,65$ ,  $p<0,001$ ), ОТ ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ), возрастом дебюта заболевания ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ ), базальной ( $r=0,54$ ,  $p<0,001$ ) и стимулированной секрецией С-пептида ( $r=0,45$ ,  $p=0,016$ ).

Следуя определению LADA, в момент манифестации пациенты не нуждаются в инсулинотерапии, однако, в течение последующих 6 лет развивается значительное снижение  $\beta$ -клеточной функции [Borg H., Gottsater A., Landin-Olsson M., 2001]. В некоторых исследованиях было показано, что падение функции  $\beta$ -клеток у пациентов с LADA, регистрируемое по уровню С-пептида, может затягиваться на 12 лет [Borg H., 2002].

Кроме того, предшествующими исследованиями показано, что высокий титр аутоантител ассоциирован с более быстрым угасанием эндогенной секреции инсулина, в то время как низкий титр, особенно ICA-Ab, связан с более медленным темпом развития потребности в инсулинотерапии [Scholin A, Torn C, 2004].

Исследование эндогенной секреции инсулина при LADA проводилось с использованием многих методологических подходов: мониторинг базального (тощакового) уровня С-пептида, исследование секреторного ответа С-пептида на пероральную или внутривенную нагрузку глюкозой,

инъекции глюкагона, в тесте толерантности к смешанной пище (ТТСП). Нет однозначных данных коррелируют ли результаты данных тестов между собой. Тем не менее, в ряде исследований получены данные о снижении секреции базального и стимулированного уровня инсулина (С-пептида) через 3 года [Gottsater A, 1993], через 5 лет при наличии 2 и 3 аутоантител, и даже через 12 лет после дебюта заболевания – при наличии позитивного титра только одного аутоантитела (только GAD-Ab или ICA-Ab) [Borg H, Gottsater A, 2002].

Клиническая оценка потребности в инсулинотерапии была рекомендована ВОЗ [Lindholm E, 2001], предложена классификация стадий СД, в основе которой лежит оценка эндогенной секреции инсулина. В связи с этим рекомендуется разделять цель применения инсулинотерапии – является ли она жизненно важной с точки зрения предотвращения кетоацидоза или необходимой только для достижения оптимального метаболического контроля. Финскими исследователями модифицирована схема ВОЗ [Tuomi T. 2010], в которой отражен гормонально-метаболический континуум всех вариантов СД, в том числе и LADA (рис.16).

Также интересны подходы к оценке отрезных (cut-off) линий для оценки нормального/сниженного уровня С-пептида натощак и после стимуляции. Некоторыми исследователями предложено заменить оценку секреторных резервов  $\beta$ -клетки по потребности в инсулинотерапии через 1 год после манифестации СД (преимущественно клиническая оценка), на лабораторную оценку стимулированного уровня С-пептида с условным диагностическим уровнем 0,6-0,7 нмоль/л (1,8-2,1 нг/мл, коэффициент пересчета 0,331) [Greenbaum C. J., Mandrup-Poulsen T., Friedenberг McGee P., 2008].

Существует и другая оценка секреторного ответа С-пептида, используемая в оценке конечных точек знаменитого исследования DCCT



[M.W. Steffes, 2003]. В этом исследовании по секреторному ответу выделено 4 группы лиц: с неопределяемой стимулированной секрецией С-пептида – менее 0,03 нмоль/л (менее 0,09 нг/мл), минимальный секреторный ответ – С-пептид от 0,04-0,2 нмоль/л (0,12-0,6 нг/мл), отвечающие (респондеры) на старте – С-пептид от 0,21-0,5 нмоль/л и менее 0,2 нмоль/л через год терапии, и стабильные респондеры – С-пептид в диапазоне 0,21-0,5 нмоль/л (0,63-1,51 нг/мл) в начале и через год наблюдения (терапии).

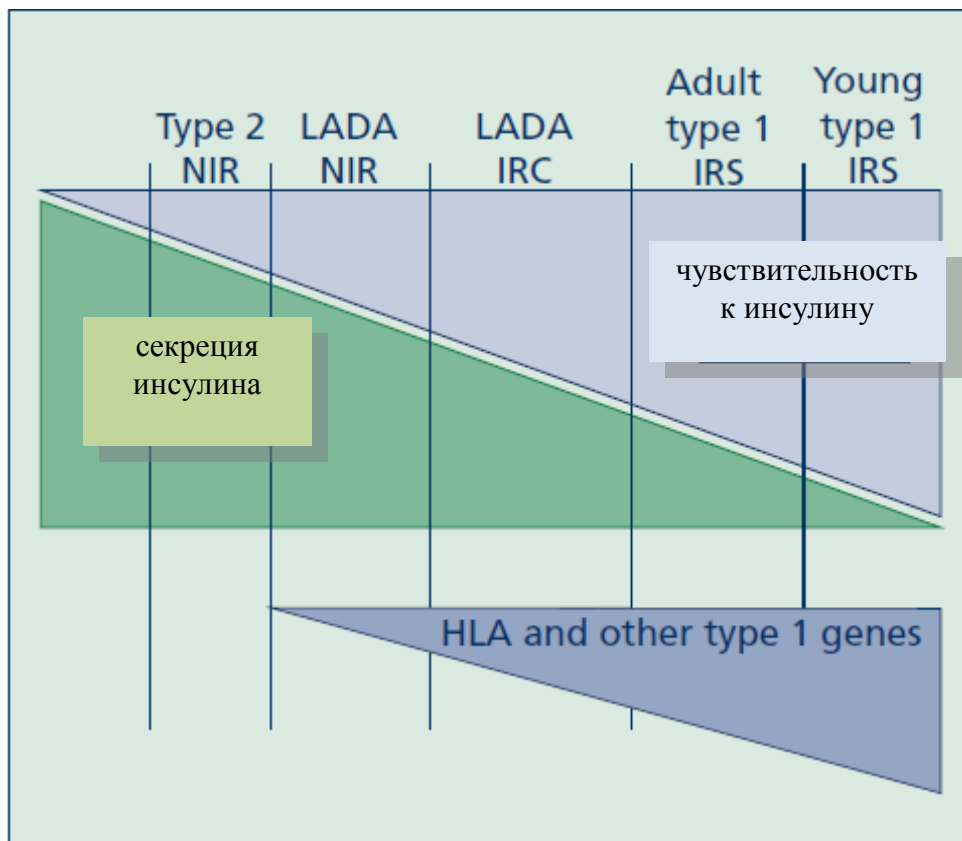


Рис. 16. Схема (ВОЗ) гормонально-метаболического континуума сахарного диабета (в модификации Tuomi T. 2010)

**Примечание:** type 2 NIR (not insulinrequiring - не требующие инсулинотерапии), LADA NIR (не требующие инсулинотерапии пациенты с LADA), LADA IRC (insulin requiring for control) – пациенты с LADA, нуждающиеся в инсулинотерапии для контроля диабета, Adult type 1 IRS (insulin requiring for survival) – взрослые пациенты с СД1, требующие инсулинотерапии для выживания, Young type 1 IRS – дети и подростки с СД1, требуется инсулинотерапия для выживания.

Для оценки продукции инсулина и функционального резерва  $\beta$ -клеток было выполнено исследование базальной и стимулированной (на 120 мин ТТСП) секреции С-пептида (табл. 17). В нашем исследовании приняты

следующие условные диагностические критерии: уровень С-пептида натощак (базального) считался сниженным при его концентрации  $< 1,0$  нг/мл, повышенным уровнем С-пептида натощак при его концентрации  $> 3,0$  нг/мл, снижением секреторного ответа  $\beta$ -клеток считали повышение С-пептида на 120 мин ТТСП менее, чем в 1,5 раза относительно базального [Vendrame F, Zappaterreno A, Dotta F., 2004; Palmer J. P., 2004; Greenbaum C. J., 2008].

У пациентов с LADA регистрировался промежуточный уровень С-пептида натощак по сравнению с пациентами с СД1 и СД2, достоверно различавшимися между собой. Обращал на себя внимание тот факт, что при стаже диабета до 4 лет величина базальной концентрации С-пептида в сыворотке крови у пациентов с LADA соответствовала этому показателю при СД2 и была достоверно выше, чем у больных СД1. Однако после четырех лет болезни значения базальной концентрации С-пептида у больных LADA были аналогичны таковым у пациентов с СД1; кроме того, отмечалась тенденция к снижению базальной секреции С-пептида при LADA, по сравнению с пациентами с СД2 (табл. 17). Указанные изменения отражают быстрое снижение секреторной способности  $\beta$ -клеток при их аутоиммунном повреждении.

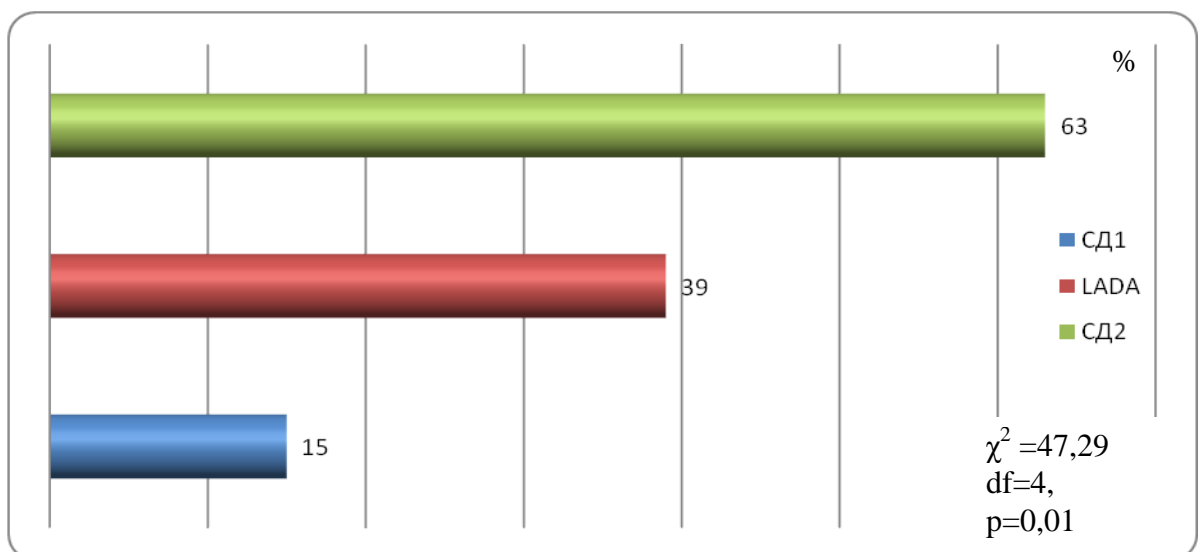


Рис. 17. Доля пациентов с сохранным тощачковым уровнем С-пептида (%) при различных вариантах сахарного диабета

Кроме того, показано, что обследованные группы достоверно различались по доле пациентов со сниженным уровнем С-пептида ( $< 1,0$  нг/мл), причем, пациенты с LADA по данному критерию занимали промежуточное положение по сравнению с таковым у пациентов с СД1 и СД2 (табл. 17).

У больных СД2 доля пациентов с повышенным уровнем С-пептида ( $> 3,0$  нг/мл) была достоверно выше, чем среди больных с СД1 (табл. 17), что подтверждает предположение об исключительной роли инсулинорезистентности в механизмах формирования СД2.

Базальная секреция С-пептида у пациентов с СД в общей выборке прямо коррелировала с ИМТ ( $r=0,55$ ,  $p<0,001$ ), ОТ ( $r=0,28$ ,  $p=0,001$ ), возрастом дебюта заболевания ( $r=0,19$ ,  $p=0,029$ ). Отмечена отрицательная корреляционная зависимость базального С-пептида от продолжительности болезни ( $r = -0,19$ ,  $p=0,032$ ) и уровня ICA ( $r = -0,35$ ,  $p=0,004$ ).

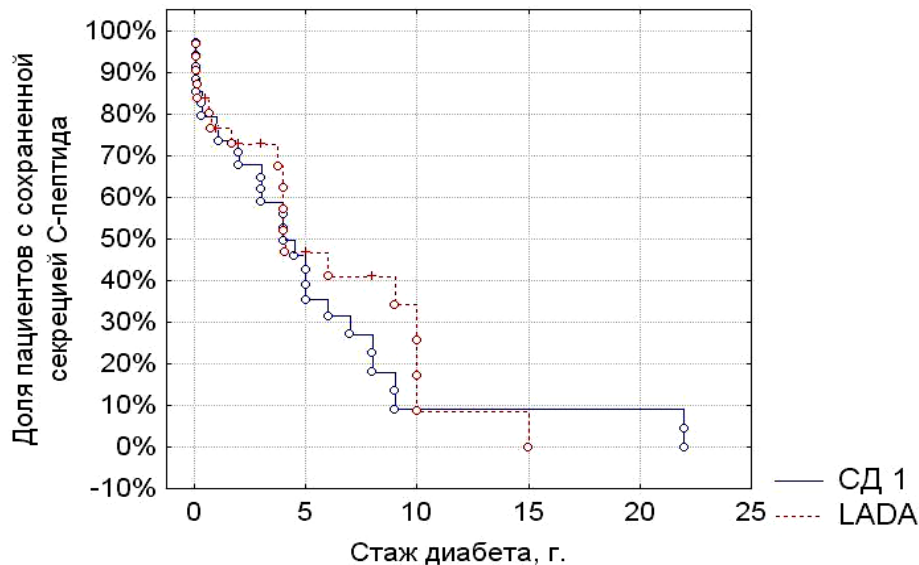
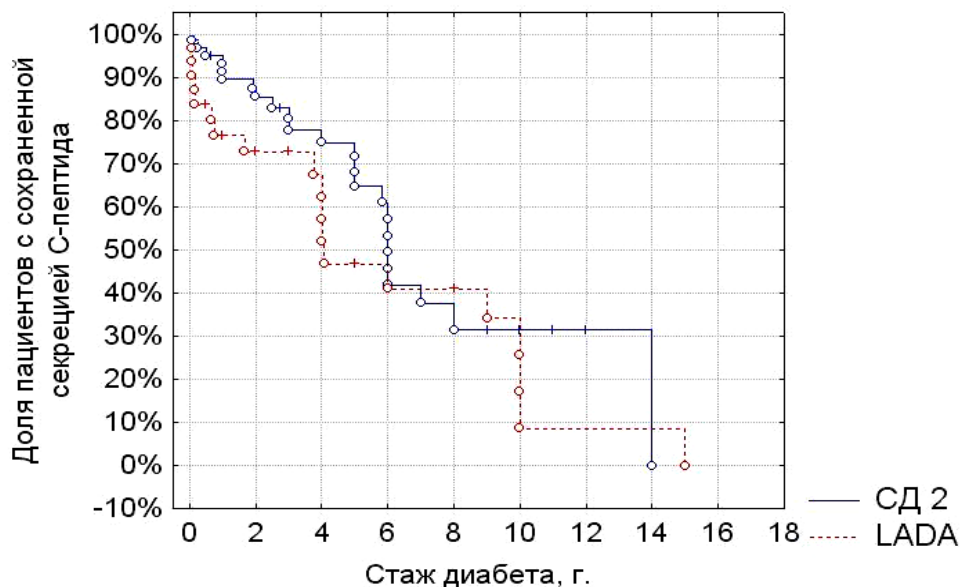


Рис. 18. Характеристика снижения базального С-пептида в сыворотке крови у больных LADA и СД1 в зависимости от длительности диабета. Пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным уровнем С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненной базальной секрецией С-пептида

Анализ различий по длительности СД до принятого нами условного уровня снижения базального С-пептида (метод Каплана-Мейера) показал, что при LADA снижение значений содержания С-пептида развивалось

достоверно позднее, чем при СД1 ( $p=0,018$ , F-критерий Кокса), что отчетливо проявлялось уже к 5 году болезни (рис. 18). Однако темпы прогрессирования снижения С-пептида при LADA были выше, чем при СД2 и различия между ними по этому критерию достоверно различались уже к 4 году заболевания ( $p = 0,012$ , F-критерий Кокса) (рис. 19).

При анализе различий по уровню стимулированного С-пептида на 120 мин ТТСП было установлено, что у пациентов с LADA и с СД1 значения его концентрации достоверно ниже, чем при СД2, причем, эти различия отмечались как при стаже заболевания до 4-х лет, так и при большей продолжительности болезни (табл. 17). Уровень стимулированной секреции С-пептида прямо коррелировал с ИМТ ( $r=0,60$ ,  $p<0,001$ ), ОТ ( $r=0,61$ ,  $p<0,001$ ), возрастом дебюта заболевания ( $r=0,32$ ,  $p=0,032$ ) и базальной секрецией С-пептида ( $r=0,90$ ,  $p<0,001$ ).



*Рис. 19. Характеристика снижения базального С-пептида в сыворотке крови у больных LADA и СД2 в зависимости от длительности диабета. Примечание: пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным уровнем С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненной базальной секрецией С-пептида.*

При анализе зависимости снижения секреторного ответа  $\beta$ -клеток (повышение уровня С-пептида на 120 мин ТТСП менее, чем в 1,5 раза относительно базального) от стажа заболевания было установлено, что при LADA снижение секреторного ответа развивалось достоверно раньше, чем

при СД2 ( $p=0,04$ , F-критерий Кокса), что отчетливо проявлялось уже к 4-му году болезни (рис. 20).

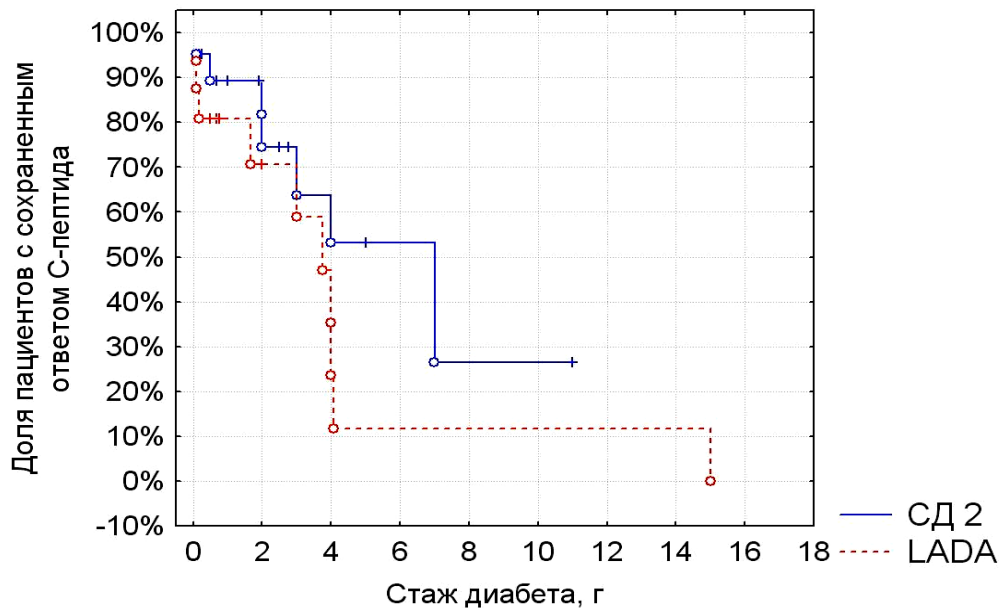
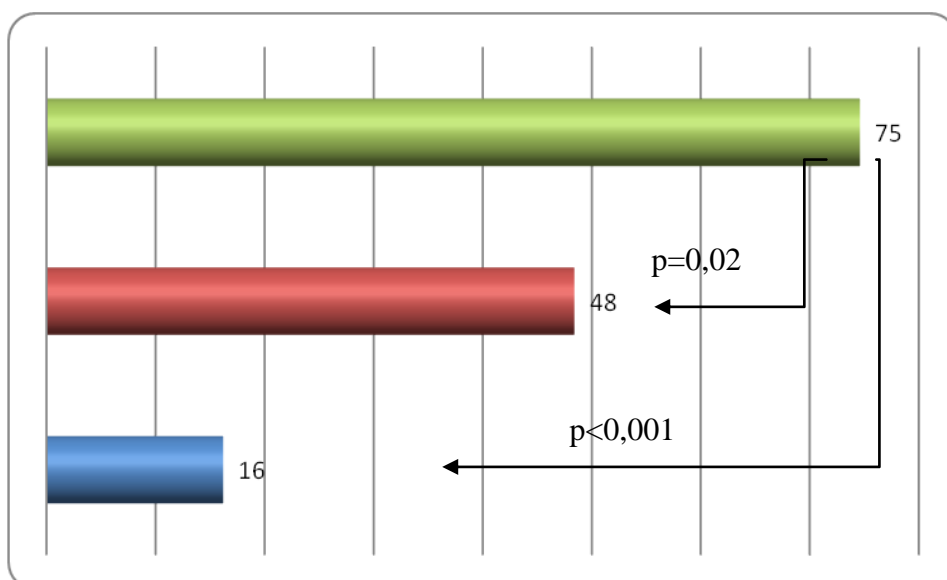


Рис. 20. Характеристика секреторного ответа С-пептида на 120 мин ТТСП у больных СД2 и LADA в зависимости от длительности диабета ( $p=0,045$ ). Примечание: пустыми кругами обозначены пациенты со сниженным секреторным ответом С-пептида, плюсами – пациенты с сохраненным ответом

В ходе проведенного исследования нами был выполнен анализ наличия у обследованных пациентов признаков метаболического синдрома, согласно критериям третьего отчета экспертной панели по обнаружению, оценке и лечению гиперхолестеринемии у взрослых (Adult treatment panel, third report, АТР III). В качестве критериев метаболического синдрома принимались следующие признаки: окружность талии - более 102 см у мужчин и 88 см у женщин, триглицериды сыворотки - 1,74 мМ и более, холестерин ЛПВП - менее 1,0 мМ у мужчин и менее 1,3 мМ у женщин, артериальная гипертензия. Два и более признака метаболического синдрома были обнаружены у 52,6 % обследованных пациентов.



*Рис. 21. Частота метаболического синдрома (согласно АТPIII), в зависимости от типа диабета*

Среди пациентов с метаболическим синдромом преобладали пациенты с СД2. Частота метаболического синдрома среди пациентов с СД2 (74,6%) была значимо выше, чем при LADA (48,4%) ( $p=0,02$ ) и при СД1 (16,2%) ( $p<0,001$ ). Однако признаки метаболического синдрома также достоверно чаще выявлялись в группе LADA, чем при СД1 ( $p=0,008$ ) (рис. 21).

Полученные нами данные, показывающие меньшую распространенность компонентов МС у пациентов LADA согласуются с рядом исследований [Tuomi T, Carlsson EL, 1999; Tripathy D, 2000; Zinman B., 2004], свидетельствует в пользу той гипотезы, согласно которой СД развивается у пациентов LADA при меньшей степени инсулинорезистентности, благодаря более выраженному секреторному дефекту инсулина, чем у пациентов с СД2.

### **3.3. Особенности продукции и спектр аутоантител к островковым клеткам поджелудочной железы при аутоиммунном сахарном диабете**

Результаты нескольких исследований говорят о том, что, несмотря на некоторое генетическое и иммунологическое сходство между сахарным диабетом 1 типа и LADA, существуют также значительные различия между этими типами в отношении антител, Т-клеток и генетических факторов. Симптомы заболевания, взятые изолированно, не позволяют достоверно дифференцировать LADA и СД2. Обязательным для диагностики LADA является оценка маркеров аутоиммунного процесса, направленного против  $\beta$ -клеток.

В проведенном нами исследовании LADA был подтвержден серологически лишь у 26% пациентов, у которых его подозревали на основании клинических критериев, предложенных группой S. Furlanos (манифестация в возрасте от 30 до 50 лет без развития кетоацидоза, ИМТ менее  $25 \text{ кг/м}^2$ , отсутствие признаков метаболического синдрома, личный и семейный анамнез аутоиммунных заболеваний) [Furlanos S., 2005; Furlanos S., Perry C., 2006], и у 10% пациентов, не удовлетворяющих этим критериям. Согласно данным автора, при наличии двух и более критериев, чувствительность и специфичность клинической диагностики составляют 90% и 71%, соответственно [Furlanos S., Dotta F., 2005; Furlanos S., Perry C., 2006]. По результатам проведенного нами исследования чувствительность и специфичность указанных клинических критериев LADA составили 70% и 57%, соответственно ( $p < 0,05$ ).

Аутоантитела хотя бы одного типа (GAD, ICA, или IAA) в крови были выявлены у 23% обследованных нами пациентов с клиническим фенотипом СД2, что позволило идентифицировать LADA у данных больных (рис. 11). Это согласуется с данными литературы относительно доли LADA в

структуре заболеваемости СД у лиц старше 35 лет (табл. 10) [Urakami T., 1995; Turner R., 1997; Borg H., 2001; Дедов И. И., 2009].

Одновременно два типа аутоантител присутствовали у 17,8% пациентов с аутоиммунным СД (без статистически значимых различий между группами LADA и СД1).

Антитела к GAD65 выявлены у 11,1% пациентов в общей выборке. Причем среди больных с клиническим фенотипом СД2 – у 12,2%, которые составляли 38,7% всех обследованных пациентов с LADA. При СД1 GAD65Ab определялись у 8,1% пациентов (табл. 18).

Таблица 18

Частота выявления и концентрация (Me[Q1-Q3]) антител к GAD, ICA и IAA в сыворотке крови больных при СД1 и LADA

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

Антитела к островковым клеткам (ICA) определялись у 23,0% пациентов в общей выборке. Детальный анализ показал, что среди больных с клиническим фенотипом СД2 ICA определялись у 22,4%, которые составляли 71,0% всех обследованных пациентов с LADA. Среди пациентов с СД1 ICA были идентифицированы у 24,3% пациентов (табл. 18).

Антитела к инсулину (IAA) выявлены у 12,6% пациентов в общей выборке. Причем, среди больных с клиническим фенотипом СД2 – у 3,1%,



составлявших 9,7% всех обследованных пациентов с LADA. При СД1 IAA выявлены у 37,8% пациентов (табл. 18).

Концентрация GAD65Ab и ICA были выше у пациентов с LADA (табл. 18). Отмечена отрицательная корреляция уровней ICA с возрастом манифестации заболевания ( $r=-0,36$ ,  $p=0,002$ ) и возрастом пациентов ( $r=-0,32$ ,  $p=0,008$ ).

Достоверных отличий концентраций IAA между группами пациентов с аутоиммунным СД выявлено не было (табл. 18). Отмечена отрицательная корреляция содержания IAA с возрастом манифестации заболевания ( $r=-0,24$ ,  $p=0,04$ ).

Остается нерешенным вопрос о роли аутоантител в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета. Данные, полученные в одной из ветви Британского проспективного исследования (UKPDS 77) относительно GAD-Ab, показали, что данный вид антител персистирует у подавляющего большинства пациентов в диапазоне от 6 мес до 6 лет от начала СД, уровень их флюктуирует, но самое важное что получили в этом исследовании, это указание на то, что с носительством GAD-Ab не связано развитие инсулинопотребности и прогрессирование СД [M. Desai, C.A. Cull, 2007].

Относительно антител к поверхностному антигену островковых клеток (ICA-Ab) большинством проведенных исследований приводятся данные о высокой предсказательной ценности данного вида антител как в отношении развития СД1, так и в отношении прогрессирования секреторной дисфункции у пациентов с LADA. Так, у родственников 1 линии родства лиц с СД1, если определялся положительный титр ICA-Ab вместе с положительным титром GAD-Ab, IAA-Ab СД1 развивался в 80% случаев на протяжении 6,7 лет наблюдения против 14% в течение 10 лет наблюдения у лиц с положительным титром GAD-Ab + IAA-Ab, но отрицательным титром ICA-Ab [Jaberi-Douraki M, Liu SW, Pietropaolo M, Khadra A., 2014]. Антитела к ICA реже встречаются при LADA, однако, их присутствие, как и при

классическом СД1, ассоциировано с HLA-DR4 и является предиктором потребности в инсулинотерапии [Bottazzo G. F, Bosi E., 2005; Tiberti C., Giordano C., 2008]. Антигенные детерминанты молекулы ICA локализуются во внутриклеточном домене. Среди больных с LADA значительно выше доля пациентов с антителами только к юкстамембранному региону (601-629) молекулы ICA, чем среди больных СД1 с классическим дебютом заболевания. Этот подтип антител к ICA (IA-2) ассоциирован с HLA-DR9 [Kawasaki E., Sera Y., 2001].

### **3.4. Особенности сахароснижающей терапии у пациентов с медленно прогрессирующим аутоиммунным диабетом взрослых**

Терапия LADA аналогична подходам, используемым при классическом СД1. Пациенты LADA, имеющие ту или иную степень ожирения, нуждаются в соблюдении субкалорийной диеты и увеличении физической активности, подобно рекомендациям при СД2. Метформин, также как тиазолидиндионы [Beales PE, Pozzilli P, 2002], возможно эффективны при LADA, так как влияют на параметры инсулинорезистентности. Kobayashi и соавт. [Kobayashi T, Nakanishi K, 1994] выделил 3 независимых фактора прогрессии бета-клеточной недостаточности при LADA – терапия глибенкламидом, продолжительность периода носительства ICA-Ab и масса тела пациента в дебюте заболевания [Kobayashi T, Nakanishi K, 1994].

Обследованные группы достоверно различались по характеру сахароснижающей терапии. Все пациенты с СД1 получали базисно-болюсную инсулинотерапию, основная масса пациентов LADA также была переведена на инсулинотерапию. Среди пациентов с СД2 доминировала терапия таблетированными сахароснижающими препаратами (табл. 19, рис. 22).

Анализ различий по длительности СД до назначения инсулинотерапии показал, что при LADA необходимость в назначении препаратов инсулина возникает достоверно раньше, чем при СД2 ( $p < 0,001$ , F-критерий Кокса) (рис. 23). Длительность СД до назначения инсулинотерапии имела прямую корреляционную связь с ОТ ( $r = 0,31$ ,  $p = 0,004$ ) и ИМТ пациентов ( $r = 0,27$ ,  $p = 0,012$ ).

Суточная доза инсулина в среднем составляла  $0,53 \pm 0,02$  ед/кг массы тела, минимальная - 0,04 ед./кг массы и максимальная - 1,08 ед./кг массы тела. Обращал на себя внимание тот факт, что в случае назначения

препаратов инсулина пациентам с LADA требовались в среднем меньшие их дозы на кг массы тела, чем больным с СД1 и СД2, что отражало наличие остаточной секреции инсулина (табл. 19).

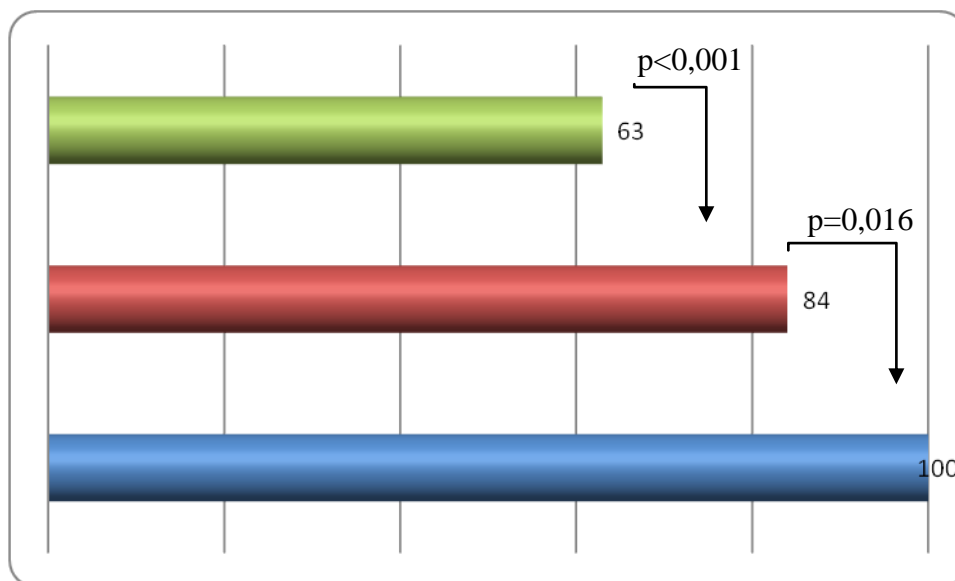


Рис. 22. Доля лиц, получающих инсулинотерапию при различных вариантах аутоиммунного сахарного диабета и СД2

Прим.  $p$  – уровень статистической значимости различий (по данным двухстороннего точного критерия Фишера)

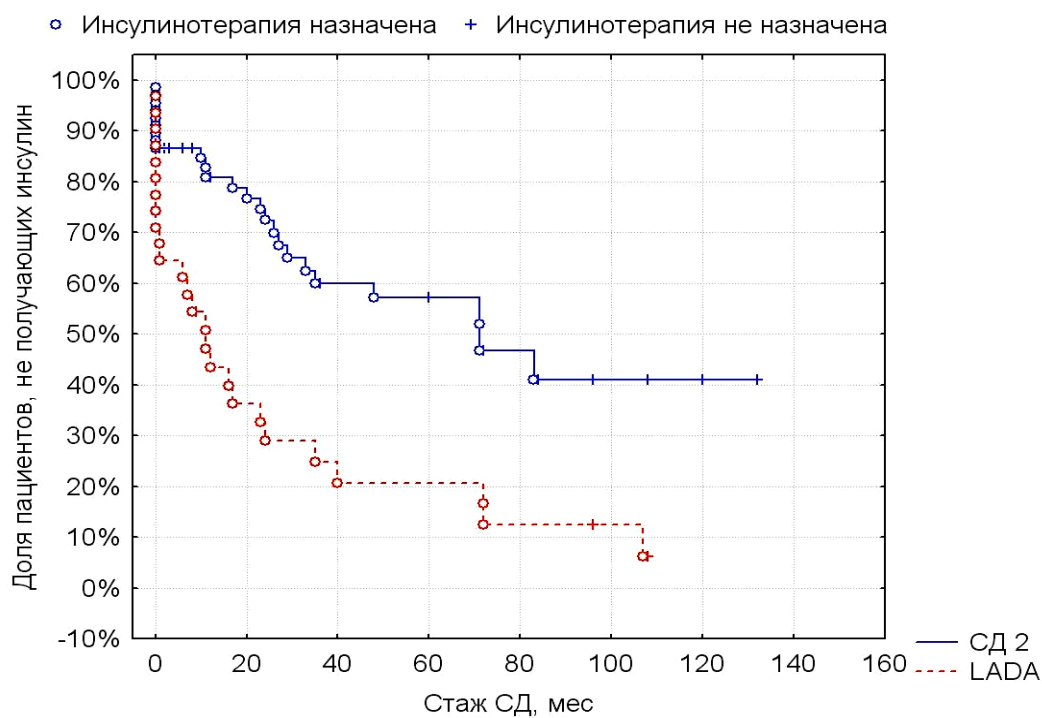


Рис. 23. Характеристика потребности в терапии инсулином пациентов с СД2 и LADA в зависимости от длительности диабета

Величина суточной дозы инсулина у обследованных пациентов с СД прямо коррелировала с ИМТ ( $r=0,26$ ,  $p=0,015$ ), стажем заболевания ( $r=0,27$ ,  $p=0,012$ ), продолжительностью инсулинотерапии ( $r=0,25$ ,  $p=0,02$ ). Отмечалась обратная зависимость между суточной потребностью в инсулине у обследованных пациентов с СД и секрецией С-пептида, как базальной ( $r = - 0,24$ ,  $p=0,025$ ), так и на 120 мин ТТСП ( $r = - 0,47$ ,  $p=0,005$ ).

Продолжительность инсулинотерапии у больных LADA был достоверно меньше, чем у пациентов с СД1. По этому параметру пациенты с LADA и группа пациентов с СД2 достоверно не различались (табл. 19).

Таблица 19

## Структура сахароснижающей терапии у пациентов с LADA и СД2

Сахароснижающая терапия	Все пациенты n=135	LADA n=31	СД2 n=67	p
Диетотерапия	3,0% (4)	6,5% (2)	3,0% (2)	$p>0,05$
Метформин (монотерапия)	14,1% (19)	6,5% (2)	25,4% (17)	<b><math>p=0,03</math></b>
Производные сульфонилмочевины (монотерапия)	2,2% (3)	0% (0)	4,5% (3)	$p>0,05$
Метформин + производные сульфонилмочевины	15,6% (21)	3,3% (1)	30% (20)	<b><math>p=0,003</math></b>
Монотерапия инсулином	56,3% (76)	67,7% (21)	26,9% (18)	<b><math>p=0,002</math></b>
Метформин + инсулинотерапия	5,2% (7)	3,3% (3)	6,0% (4)	$p>0,05$
Производные сульфонилмочевины + инсулинотерапия	1,5% (2)	0% (0)	3,0% (2)	$p>0,05$
Метформин + производные сульфонилмочевины + инсулинотерапия	2,2% (3)	6,5% (2)	1,5% (1)	$p>0,05$

Примечание: доля пациентов % (число пациентов), p - уровень статистической значимости различий частот между группами пациентов с СД2 и LADA (по данным двухстороннего точного критерия Фишера)

### Заключение

Таким образом, в обследованной нами выборке пациентов с СД2 доля больных LADA составляла 23%. Данная частота регистрации LADA является завышенной и не отражает истинной частоты по следующей причине - в наше исследование в основном включались пациенты с СД2, находящиеся на стационарном лечении. При отсутствии выраженных стадий поздних сосудистых осложнений СД причиной направления в стационар является неудовлетворительный контроль углеводного обмена, по понятным причинам, при диагностированном на амбулаторном этапе СД2 это таблетированные сахароснижающие препараты, которые не могут быть эффективны при сниженном секреторном ответе  $\beta$ -клетки у пациентов с LADA. Это объясняет некоторую «концентрированность» LADA в нашей выборке. Истинная распространенность LADA в Российской Федерации до сих пор не установлена, что требует эпидемиологических скрининговых исследований.

Процент заболевших LADA был сопоставим в разных возрастных группах (до 30 лет, 30-50 лет и 50-60 лет), в отличие от СД1 и СД2, данный факт требует подхода к любому случаю вновь выявленного СД с позиции детального изучения механизма нарушения углеводного обмена и исключения аутоиммунного СД в любом возрастном диапазоне. Тем не менее, настороженность клиницистов относительно LADA должна быть максимальной у пациентов в возрастных диапазонах до 30 лет (23% LADA среди всех диагностированных вариантов СД) и от 30 до 50 лет (26% пациентов с LADA), менее настороженными можно быть у пациентов старше 50 лет, где регистрировался самый низкий процент пациентов с LADA – только 10% и не встречался манифестный вариант СД1.

При данном патогенетическом варианте СД компоненты метаболического синдрома отмечались с промежуточной частотой, по сравнению с СД1 и СД2, что свидетельствует в пользу гипотезы, согласно

которой СД развивается у пациентов LADA при меньшей степени инсулинорезистентности, благодаря более выраженному секреторному дефекту инсулина, чем у пациентов с СД2. Уровень стимулированной секреции С-пептида у пациентов LADA превышал аналогичный при СД1, но значительно уступал секреторным возможностям при СД2. Следует отметить, что в первые четыре года заболевания лица с LADA по данному показателю не отличались от пациентов с СД2, а затем темп снижения стимулированной секреции С-пептида у пациентов данной группы сравнивался с аналогичным показателем у больных СД1.

Неожиданной находкой у пациентов LADA в нашем исследовании являлась большая распространенность в данной группе хронического аутоиммунного тиреоидита, превышающая частоту регистрации АИТ у пациентов с СД1 классического течения. Спектр аутоантител при LADA отличался превалированием GAD65Ab и ICA, и, напротив, меньшей частотой встречаемости IAA.

В случае назначения инсулина пациентам с LADA требовались меньшие дозы инсулина на килограмм массы тела, чем пациентам с СД1 и СД2.

Общими чертами пациентов группы LADA и больных СД1 были меньший вес, ИМТ и ОТ, по сравнению с пациентами с СД2. Кроме того, при LADA, как и при СД1 значения уровня стимулированного С-пептида в сыворотке крови были ниже, чем при СД2. Содержание в сыворотке общего холестерина у пациентов с LADA и с СД1 было ниже, чем у больных СД2. Чертой сходства групп пациентов с LADA и СД1 также являлась меньшая распространенность артериальной гипертензии, чем при СД2. Потребность в назначении инсулинотерапии при LADA формировалась быстрее, чем при СД2.

Группы пациентов с LADA и больные СД2 характеризовались превалированием женщин. У пациентов данных клинических групп

отмечалось более высокое содержание в сыворотке крови триглицеридов и ЛПОНП, чем при СД1.

Сопоставление данных о наличии микрососудистых осложнений, сроках их развития и функциональном состоянии  $\beta$ -клеток поджелудочной железы подчеркивает, что падение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (аналогично СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий. Ряд исследований последних лет указывает на ангиопротективные свойства С-пептида [Maciejwska-Jeske M., Szczesna A., Meczekalski B., 2011; Vasic D., Spyranis A., 2012], проявляющиеся в защите клеток от глюкоз-индуцированного апоптоза и стимуляции их пролиферации [Li Z., Zhang W., Sima A. , 2003]. Поэтому резкое снижение концентрации С-пептида при LADA способствует развитию диабетических микрососудистых осложнений. В то же время данные факт не в полной мере объясняет разницу между клинической тяжестью течения микрососудистых осложнений при LADA и СД1.

Диагноз диабета типа LADA остается довольно трудной клинической задачей, особенно в группе пациентов среднего возраста. Неясности в генетических и иммунологических характеристиках требуют дальнейшего изучения с учетом возраста, этнической принадлежности и скорости деструкции  $\beta$ -клеток.



### **3.5. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

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

Аутоиммунный диабет развивается вследствие дефектов центральной или периферической иммунологической толерантности к клеткам островков поджелудочной железы. Вместе с тем известно, что делеция в тимусе неспособна полностью элиминировать все аутореактивные CD3+-лимфоциты. Это, в свою очередь, приводит к тому, что в организме у здоровых людей возникает «потенциальный аутоиммунный репертуар» [Moudgil K. D., Sercarz E. E., 2000]. Тем не менее, у большинства из них аутоиммунные болезни не развиваются, так как механизмы периферической толерантности (делеция, анергия, регуляторные лимфоциты) держат эти клоны под контролем.

Следующим этапом является инфильтрация островков мононуклеарными лейкоцитами [Gepts W., 1965; Richardson SJ, Morgan NG, Foulis AK., 2014]. Данные о фенотипе этих клеток у человека крайне ограничены, поскольку образцы ткани поджелудочной железы могут быть получены только с использованием биопсии [Itoh N., Hanafusa T., Miyazaki A., 1993]. В составе инфильтратов встречаются макрофаги, CD3+-клетки [Hanninen A., 1992] и CD19+-лимфоциты, депозиты иммуноглобулинов [Bottazzo G. F., 1985], что свидетельствует в пользу того, что к моменту дебюта заболевания инсулит представляет собой хронический процесс. Возможно, что CD19+-лимфоциты играют ключевую роль в инициации патологического процесса, поскольку у NOD мышей с нарушением

формирования CD19<sup>+</sup>-клеток СД не развивается, несмотря на наличие других АПК [Serreze D. V., 1996].

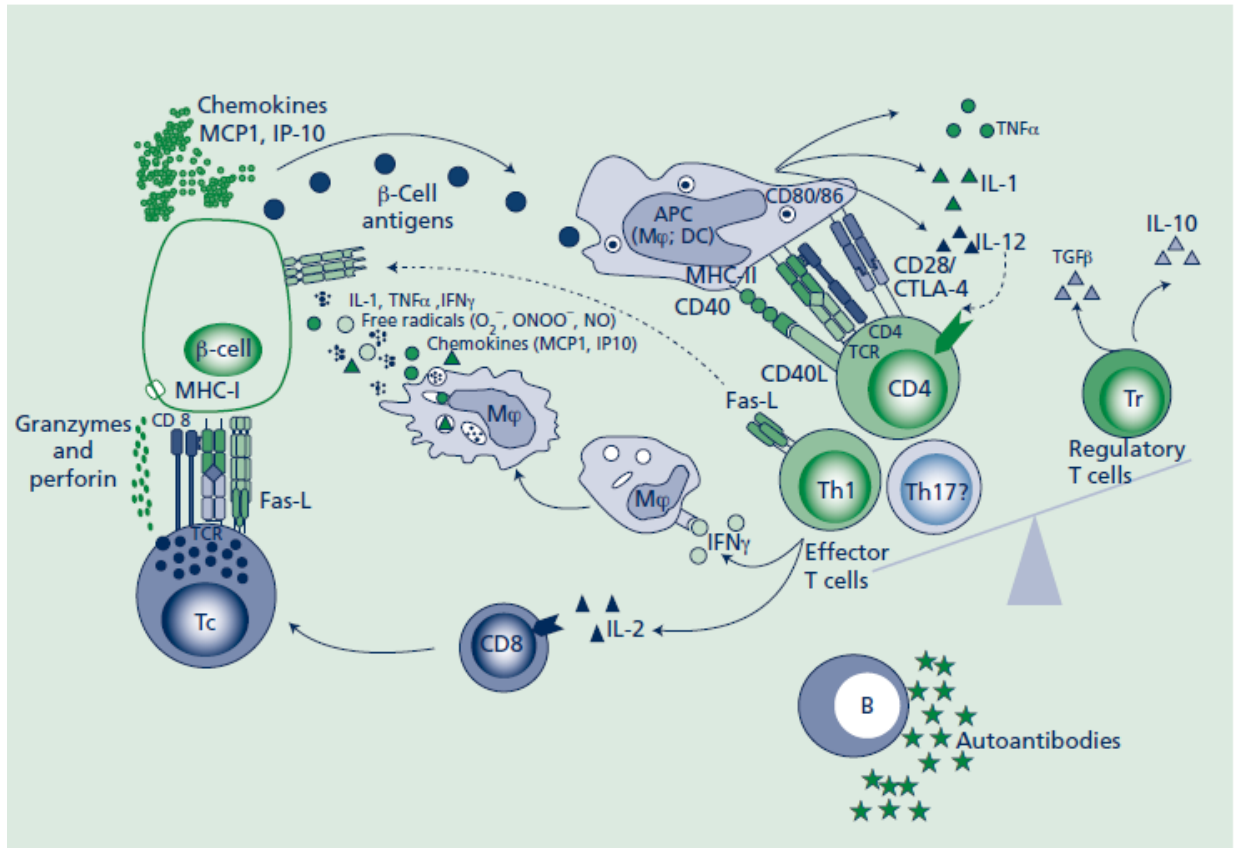


Рис. 24. Предлагаемая модель взаимодействия иммунокомпетентных клеток в патогенезе сахарного диабета типа 1 (заимствовано из [H. Korff, C. Gysemans, L. Overbergh, C. Mathieu, 2010]).

Вирусные инфекции или другие провоцирующие факторы инициируют гиперактивный ответ против  $\beta$ -клеток, освобождая их антигены и, возможно, хемокинов, которые могут внести вклад в наведение и активации Т-лимфоцитов и антиген-представляющих клеток (АПК) в островки. Антигены  $\beta$ -клеток презентуются в сочетании с молекулами МНС II класса CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам после процессинга дендритными клетками и В-лимфоцитами. АПК секретируют IL-12, активирующий CD4<sup>+</sup> хелперные Т-клетки (Th1), которые в свою очередь, продуцируют IFN $\gamma$  и IL-2. Кроме того, продукция IL-6 и TGF – в дендритными клетками способствует запуску дифференцировки Th17 из наивных Т-лимфоцитов. Тем не менее, точная роль недавно выявленного подтипа Т-хелперов, секретирующих IL-17 в патогенезе СД1 не совсем ясна. Привлеченные макрофаги и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты ответ на эти цитокины приобретают цитотоксические свойства (Tc) и являются источниками IL-1 $\beta$ , TNF- $\beta$ , IFN $\gamma$ , свободных радикалов и хемокинов в клеточном инфильтрате. CD8<sup>+</sup> Т клетки распознают антигены в-клеток, в сочетании с молекулами МНС I класса.  $\beta$ -клетки также могут быть подвергнуты Fas-опосредованной клеточной смерти и/или через воздействие гранзима/перфорина. Регуляторные Treg–клетки либо функционально неактивны либо их количество недостаточно.

По данным ряда авторов, при аутоиммунном СД у человека отмечаются различные нарушения функций CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови [Al-Sakkaf L., 1989; Atkinson M. A., 1994; Buschard K., 1990; Peakman M., 1993; Petersen L. D., 1996; Roep B. 1999; Smerdon R. A., 1993]. У пациентов с СД1 были обнаружены нарушения соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Во многих из этих исследований было выявлено повышение числа активированных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов. Указанное состояние активации могло быть вызвано дефектом созревания лимфоцитов [Faustman D., 1989] либо являлось следствием постоянного их прайминга аутоантигенами островков [Petersen L. D., 1993, 1996, 1999].

Таким образом, в настоящее время можно с полной уверенностью принять следующее положение: формирование СД1 и LADA является результатом нарушения тонкого равновесия между субпопуляциями аутореактивных и регуляторных лимфоцитов, реализующегося в срыв иммунологической толерантности по отношению к  $\beta$ -клеткам. Между тем не решенным остается вопрос, какие особенности аутоиммунного процесса при LADA определяют менее агрессивное течение инсулита при данном патогенетическом варианте аутоиммунного диабета.

В проведенном нами исследовании отмечено снижение количества лимфоцитов в крови при СД по сравнению со здоровыми лицами (табл.20). Прогрессивное снижение лимфоцитов с последующим развитием лимфопении при различных вариантах СД отмечено и в работах других авторов [Fuller J.M. et al., 2009]. Ранее данный феномен связывали исключительно с влиянием гипергликемии и метаболическими эффектами терапевтического вмешательства. В последние годы в ряде исследований указывается на то, что развитие аутоиммунного СД и формирование при этом лимфопении ассоциировано с мутациями в гене, кодирующем белок GIMAP5 (GTPase of the immune-associated protein 5) [Schulteis R.D. et al., 2008; Fuller J.M. et al., 2009; Wong V., Saunders A.E., Hutchings A. et al., 2010;

Bahr J. et al., 2011]. Данный протеин локализуется преимущественно в митохондриях и лизосомах лимфоцитов, и способен подавлять реализацию митохондриального пути апоптоза [Dalberg U. et al., 2007; Schulteis R.D. et al., 2008], снижать активность лизосомальных ферментов, предотвращая тем самым пермеабиллизацию мембран [Kirkegaard T., Jaattela M., 2009; Wong V. et al., 2010]. Таким образом, функции GIMAP5 направлены на созревание и выживание на периферии Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток. Исследования показывают, что при аутоиммунном СД мутации сдвига рамки считывания гена *GIMAP5* ведут к спонтанной гибели путем апоптоза преимущественно CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, Т-regs-лимфоцитов, NK-клеток и селективному выживанию аутореактивных Т-лимфоцитов [Poussier P. et al., 2005; Schulteis R.D. et al., 2008; Wong V. et al., 2010]. Следует отметить, что в нашей работе зафиксировано повышение процентного количества Т-лимфоцитов при аутоиммунных вариантах сахарного диабета (табл.20), возможно связанное с увеличением пула аутореактивных и эффекторных лимфоцитов.

Результаты наших исследований не позволяют говорить о развившейся у пациентов с СД1 и LADA лимфопении, поскольку абсолютное содержание лимфоцитов в крови у обследованных лиц превышает  $1,0 \cdot 10^9/\text{л}$ . Однако явление снижения количества этих клеток при СД относительно здоровых доноров, в частности за счет популяции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD16<sup>+</sup>CD56<sup>low</sup>-клеток (табл.20), вероятно является отражением описанных выше механизмов и с течением времени может перейти в лимфопению. Помимо этого нельзя исключать, что определенный вклад в снижение содержания циркулирующих в крови субпопуляций цитотоксических лимфоцитов и клеток натуральных киллеров связано с их миграцией в поджелудочную железу с формированием воспалительного инфильтрата. Отсутствие биопсии ткани поджелудочной железы человека не дает возможности проверить данную гипотезу, но исследования, проведенные на модели аутоиммунного СД у животных участие CD8<sup>+</sup>- и

NK-клеток в развитии инсульта не отвергают [Lieberman S.M. et al., 2003; Dogan Y. et al., 2006]. Подтверждением того, что уменьшение в циркуляции количества цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток, а также повышение содержания Т-лимфоцитов первоначально связано с аутоиммунным компонентом развития СД1 и LADA, а не метаболическими изменениями в организме, вызванными гипергликемией или терапевтическим воздействием, является установленное в нашем исследовании отсутствие подобных сдвигов в иммунной системе при СД2 (табл. 20).

У пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом было проведено сравнение показателей в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет), а также наличия микрососудистых осложнений (ретинопатия, нефропатия), не выявившее статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ). В результате этого последующее изучение содержания лимфоцитов в крови и их субпопуляционного состава у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом проводилось только в зависимости от нозологического варианта сахарного диабета.

Оценивая общее количество лимфоцитов в крови установили, что абсолютное значение данного показателя достоверно снижено у пациентов с СД1 ( $p = 0,025$ ), LADA ( $p = 0,004$ ) и СД2 ( $p = 0,001$ ) по сравнению со здоровыми донорами. Наименьшее абсолютное содержание лимфоцитов наблюдалось при LADA, при этом имелась выраженная тенденция к снижению значения данного параметра относительно значения показателя при СД1 ( $p = 0,05$ ). Достоверных отличий в относительном содержании лимфоцитов в изучаемых группах обнаружено не было (табл. 20).

Таблица 20

Содержание в крови лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом  
(Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		Здоровые доноры (n=30)	СД1 (n=37)	LADA (n=31)	СД2 (n=67)
Общее количество лимфоцитов	%	35,00 (22,00-48,00)	36,00 (31,50-40,00) p <sub>1</sub> >0,05	29,00 (28,00-34,00) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	32,00 (25,00-36,00) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
	10 <sup>9</sup> /л	2,63 (2,43-2,84)	1,93 (1,60-2,28) <b>p<sub>1</sub>=0,025</b>	1,55 (1,20-1,67) <b>p<sub>1</sub>=0,004</b> <b>p<sub>2</sub>=0,05</b>	1,65 (1,32-2,22) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты	%	69,70 (65,94-70,90)	73,69 (70,86-76,18) <b>p<sub>1</sub>=0,04</b>	75,81 (73,13-79,31) <b>p<sub>1</sub>=0,008</b> p <sub>2</sub> >0,05	71,41 (65,97-75,13) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 <b>p<sub>3</sub>=0,01</b>
	10 <sup>9</sup> /л	1,32 (1,24-1,36)	1,39 (1,22-1,59) p <sub>1</sub> >0,05	1,41 (1,12-1,52) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	1,33 (1,07-1,50) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05

Продолжение таблицы 20					
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты	%	24,28 (23,93-29,48)	25,35 (21,73-31,84) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b>	26,03 (21,69-29,41) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	22,60 (17,98-26,60) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>3</sub>=0,04</b>
	10 <sup>9</sup> /л	0,32 (0,30-0,37)	0,23 (0,19-0,30) <b>p<sub>1</sub>=0,009</b>	0,22 (0,14-0,28) <b>p<sub>1</sub>=0,007</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	0,30 (0,25-0,41) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>=0,04</b> <b>p<sub>3</sub>=0,02</b>
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты	%	44,30 (34,16-45,81)	45,03 (41,38-50,26) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b>	45,87 (38,67-50,65) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	45,82 (40,07-50,07) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>3</sub>&gt;0,05</b>
	10 <sup>9</sup> /л	0,46 (0,44-0,57)	0,44 (0,39-0,66) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b>	0,46 (0,35-0,55) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	0,43 (0,34-0,54) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>3</sub>&gt;0,05</b>
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>lo</sup> w- лимфоциты	%	17,24 (16,18-19,88)	13,71 (10,37-17,07) <b>p<sub>1</sub>=0,03</b>	11,60 (9,10-14,36) <b>p<sub>1</sub>=0,007</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	17,98 (13,46-22,25) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>=0,06</b> <b>p<sub>3</sub>=0,005</b>

	Продолжение таблицы 20				
	10 <sup>9</sup> /л	0,84 (0,66-0,87)	0,87 (0,70-0,99) p <sub>1</sub> >0,05	0,81 (0,63-0,93) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	0,84 (0,71-0,96) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
CD19 <sup>+</sup> -лимфоциты	%	10,78 (8,09–14,18)	12,06 (8,80-13,06) p <sub>1</sub> >0,05	11,13 (6,87-13,86) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	9,39 (7,07-11,81) p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>=0,04</b> p <sub>3</sub> >0,05
	10 <sup>9</sup> /л	0,20 (0,15-0,27)	0,23 (0,16-0,29) p <sub>1</sub> >0,05	0,16 (0,11-0,23) p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>=0,04</b>	0,18 (0,13-0,25) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05

Примечание: p<sub>1</sub> – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров; p<sub>2</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1; p<sub>3</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA; n – количество обследованных лиц



Рассматривая субпопуляционный состав лимфоцитов крови при аутоиммунных вариантах сахарного диабета, были получены следующие результаты. Относительное содержание Т-лимфоцитов у пациентов с СД1 ( $p=0,04$ ) повышалось по сравнению с показателем в группе здоровых доноров. Относительное содержание Т-клеток у больных СД1 достоверно не отличалось от аналогичного показателя при LADA и СД2. В свою очередь при латентном аутоиммунном диабете взрослых выявлено увеличение процентного содержания  $CD3^+$ -лимфоцитов по отношению к здоровым донорам ( $p=0,008$ ), а также группе сравнения (пациентам с СД2) ( $p=0,01$ ). Между всеми рассматриваемыми группами не выявлено достоверных отличий в абсолютном содержании Т-клеток ( $p>0,05$ ) (табл. 20).

Оценка абсолютного и относительного содержания в крови  $CD4^+$ -лимфоцитов не выявила достоверных различий в исследуемых группах пациентов ( $p>0,05$ ) (табл. 20).

Теперь ясно, если  $CD4^+$ лимфоциты имеют решающее значение для прогрессирования аутоиммунного инсулита, тем не менее, его развитие требует участия и МНС класса I зависимых аутореактивных Т-клеток ( $CD8^+$ ) на разных стадиях заболевания. Независимый вклад  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в диабетогенных аутоиммунных реакциях был оценен в эксперименте по способности отдельных Т-клеточных субпопуляций, полученных от NOD мышей с СД1, передавать (transfer) диабет новорожденным NOD мышам или NOD с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами [Dilorenzo T.P., 1998; Herold KC, 2002].

Аутоантигены  $\beta$ -клеток распознаются  $CD8^+$ -клетками, за этим следует повреждение экспрессирующих молекулы МНС I класса клеток, через секрецию цитотоксических цитокинов (например, интерферона  $IFN\gamma$  или через секрецию ими перфорины/гранзимов (рис. 24).

Интересно отметить, что в клинических исследованиях, посвященных изучению протективных свойств анти- $CD3^+$ -моноклональных антител при

СД1, у пациентов с наилучшими показателями по восстановлению эндогенной секреции инсулина, увеличивалось соотношение  $CD8^+/CD4^+$  - клеток [Korf H., Gysemans C., Overbergh L., Mathieu C., 2010].

При оценке количества в крови цитотоксических лимфоцитов установлено достоверное снижение абсолютного числа клеток данной популяции у пациентов с СД1 и LADA относительно группы здоровых добровольцев ( $p=0,009$  и  $p=0,007$ , соответственно) и группы сравнения (пациентов с СД2) ( $p=0,04$  и  $p=0,02$ , соответственно). Межгрупповых отличий среди пациентов с СД аутоиммунного генеза (СД1 и LADA) по рассматриваемому показателю не обнаружено. Изменение процентного содержания  $CD8^+$ -лимфоцитов наблюдалось только у пациентов с LADA в сторону увеличения показателя относительно группы пациентов с СД2 ( $p=0,04$ ) (табл. 20).

Показатель относительного содержания в крови циркулирующего пула лимфоцитов-киллеров ( $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов) снижался у пациентов с аутоиммунными вариантами СД. Так, при СД1 установлено достоверное уменьшение количества  $CD16^+CD56^{low}$ -клеток по сравнению с контрольной группой ( $p=0,03$ ), а также – выраженная тенденция к снижению показателя относительно группы пациентов с СД2 ( $p=0,06$ ). В группе LADA выявлено достоверное снижение количества циркулирующих лимфоцитов-киллеров относительно здоровых лиц ( $p=0,007$ ) и группы сравнения ( $p=0,005$ ). Изменений абсолютного содержания  $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов в изучаемых группах установлено не было ( $p>0,05$ ) (табл.20).

Популяция  $CD16^+CD56^{low}$ -лимфоцитов объединяет две субпопуляции -NK-клетки и NKT-клетки, играющие важную роль в иммунопатогенезе СД1.

NK-клетки представляют собой особую популяцию больших гранулярных лимфоцитов. Эти клетки способны лизировать клетки-мишени, инфицированные вирусами и другими внутриклеточными агентами,

мутировавшие опухолевые клетки, а также любые другие клетки аллогенного или ксеногенного происхождения. NK клетки действуют по принципу поиска «пропавшего своего». При контакте с мишенью NK оценивают присутствие на клетке неизмененных МНС I . Контакт ингибирующего рецептора с этой молекулой вызывает формирование ингибирующего сигнала и защищает клетку от цитолитической активности NK. В отсутствии сигнала от нормальной молекулы МНС I NK клетка-мишень уничтожается с помощью эффекторных белков NK – гранзима В и перфорины. К ингибиторным рецепторам относится Ly49 у мышей, KIR у человека и лектино-подобный гетеродимер CD94-NKG2A у человека и мыши. Кроме цитолитического эффекта NK оказывают регуляторное действие на других участников иммунного ответа – дендритные, Т- и В-клетки посредством цитокинов или непосредственного контакта [Berntman E, Rolf J, Johansson C, Anderson P, Cardell SL., 2005].

NKT-клетки - уникальный подкласс Т-клеток, которому присущи фенотипические особенности как Т-клеток, так и NK-клеток. NKT несут на своей поверхности Т-клеточный рецептор (ТКР) и маркеры NK-клеток (CD16, CD56, CD161). Особенностью «классических» инвариантных NKT (iNKT) является экспрессия инвариантного ТКР (V $\beta$ 24-J $\beta$ Q, V $\beta$ 11), который распознает гликолипидный антиген в комплексе с неклассической молекулой МНС I класса - CD1d. Выделяют также «неклассические» инвариантные NKT, которые способны распознавать CD1d, но при этом экспрессируют другие варианты ТКР. Известно, что у человека среди NKT-встречаются как CD4-CD8-, CD4+CD8-, а также CD4-CD8+-NKT-клетки [Berntman E, Rolf J, Johansson C, Anderson P, Cardell SL., 2005].

Известно, что NKT-клетки способны мигрировать в ткань поджелудочной железы, регулируя аутоиммунные атаки *in situ*, например, за счет киллинга аутоагрессивных цитотоксических лимфоцитов или угнетения их функции. Механизм миграции NKT-клеток объясняется

экспрессией эндотелиоцитами в поджелудочной железе CD1d и распознаванием NKT-клетками своего лиганда. Протективная роль NKT-клеток также доказывается уменьшением доли этих клеток при переходе начальных этапов иммунных реакций в деструктивную фазу инсулита либо увеличением их доли в инфильтрате при разрешении аутоиммунного инсулита и выздоровления экспериментальных животных [Berntman E, Rolf J, Johansson C, Anderson P, Cardell SL., 2005]. Подчеркивается важность исследования данной популяции клеток в клинических исследованиях при аутоиммунном СД, так как у NOD мышей регистрировалось снижение количества NKT-клеток в региональных лимфатических узлах, но не в периферической крови. В частности, если роль NKT-клеток в отрицательной регуляции локальных аутоиммунных атак подтвердится и у человека, то перспективным является разработка технологии активации NKT-клеток с помощью  $\beta$ GalCer, с помощью которой удавалось предотвращать развитие аутоиммунного деструктивного инсулита после его индукции у экспериментальных животных [Berntman E, Rolf J, Johansson C, Anderson P, Cardell SL., 2005].

Содержание (абсолютное и относительное) В-лимфоцитов в группах пациентов с аутоиммунными вариантами СД (СД1 и LADA) не отличалось от аналогичных параметров в группе здоровых доноров ( $p>0,05$ ). Однако, в группе пациентов с СД1 выявлено повышение относительного количества CD19<sup>+</sup>-клеток по сравнению с пациентами с СД2 ( $p=0,04$ ), а также увеличение абсолютного содержания данной субпопуляции лимфоцитов относительно группы пациентов с LADA ( $p=0,04$ ) (табл. 20).

Сравнительно недавно стало известно, что В-лимфоциты играют важную роль в иммунопатогенезе СД1 на этапе индукции аутоиммунного инсулита. Важная роль В-клеток в этом процессе, как полагают, связаны с их антиген-представляющей функцией совместно с молекулами МНС II класса. Данный феномен был ярко продемонстрирован в эксперименте с

NOD мышами у которых ограничили экспрессию I-A<sup>G7</sup> В-лимфоцитами (NOD B<sup>CIDD</sup>), необходимую для процессинга аутоантигенов. Данная линия мышей оказалась надежно защищена от развития спонтанного аутоиммунного диабета, несмотря на то, что функция других АПК не была нарушена [Noorchashm H, 1999].

Способность В-клеток эффективно поглощать  $\beta$ -клеточные антигены через связывание их поверхностными Ig имеет решающее значение для этой функции, так как ингибирование Ig-опосредованного поглощения антигенов отменяет презентацию антигена В-лимфоцитами, что продемонстрировано *in vitro* [Falcone M, 1998], также как трансгенные манипуляции, изменяющие специфику поверхностных Ig В-лимфоцитов приводят к изменению заболеваемости СД1 у NOD мышей [Hulbert C, 2001].

Таким образом, аутореактивных В-клетки могут быть эксклюзивно эффективны в захвате и представлении аутоантигенов, что приводит к аутоиммунной активации Т-клеток (рис.25). С точки зрения терапевтических потенций данного феномена, то он подтвержден в экспериментальных моделях – истощение популяции В-лимфоцитов с помощью анти-CD20 антител снижает заболеваемость аутоиммунным сахарным диабетом у NOD мышей и даже способно обратить вспять уже развившееся заболевание [Hu CY, Rodriguez-Pinto D, DuW, 2007]. Эти результаты были успешно ретранслированы в клинических исследованиях на человека [Pescovitz MD, Greenbaum CJ, 2009].

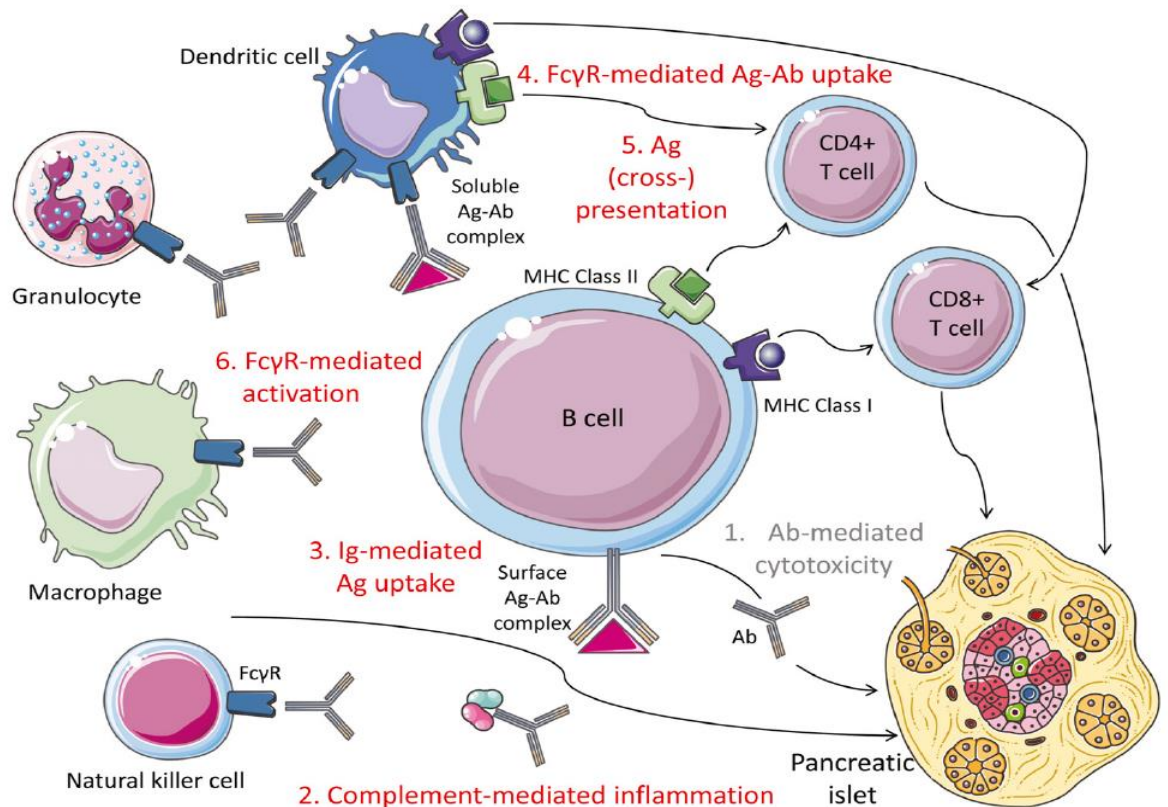


Рис. 25. Механизм вовлеченности В-лимфоцитов в индукцию аутоиммунного инсулита (заимствовано из [Roberto Mallone, Vedran Brezar, 2011]).

**1) АТ-опосредованная цитотоксичность.** Имеющиеся данные позволяют исключить прямое патогенное воздействие ауто-АТ на  $\beta$ -клетки.

**2) комплемент-опосредованное воспаление.**

**3) Ig-опосредованное поглощение антигена (АГ).** Этот механизм позволяет аутореактивным В-лимфоцитам высокоэффективно осуществлять процессинг и представление аутоантигенов в-клеток через связывание их на своей поверхности с помощью Ig.

**4) Fc $\gamma$  рецепторов (Fc $\gamma$ R)-опосредованное поглощение комплекса «аутоантиген-антитело».** Растворимые комплексы «антиген-антитело» хорошо распознаются (дендритные клетки и другие антиген-представляющие клетки через распознавание Fc $\gamma$ R).

**5) презентация и (кросс-) презентация антигена.** в-клеточные ауто-АГ, обработанные В-клетками и ДК, презентируются CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам в

комплексе с HLA II молекулами и кросс-презентируются CD8<sup>+</sup> Т-клеткам совместно с молекулами HLA I класса, что приводит к активации аутореактивных Т-клеток.

**б) FcγR-опосредованная активация.** Некоторые FcγR несущие клетки (NK-клетки, макрофаги, гранулоциты, и дендритные клетки) активируются после связывания участка FcγR с иммуноглобулиновым участком Fc. Это вызывает активацию продукции воспалительных цитокинов и созревание дендритных клеток.

### **3.6. Характеристика цитокин-секретирующей активности мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) и содержание Fas+, FasL+, TNF-RI+- лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

При сравнении показателей содержания цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количества комплементарных им рецепторов на лимфоцитах крови в зависимости от стажа заболевания (до 4-х лет, 4-10 лет) достоверных отличий выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Поэтому при описании показателей состояния системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  группы пациентов с СД представлены только с учетом варианта клинического фенотипа заболевания и наличия микрососудистых осложнений.

#### **3.6.1. Секреция *in vitro* цитокинов Th1-профиля (IL-2, IFN- $\gamma$ ) и количество CD25+- лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

Ранее считалось, что основную роль в аутоиммунном разрушении инсулин-продуцирующих клеток играют цитотоксические CD8+-лимфоциты, в то время как CD4+-лимфоциты имеют второстепенное значение [Green E.A., Flavell R.A., 1999]. Недавними исследованиями пересмотрена эта позиция, CD8+-лимфоциты принимают участие в цитотоксических реакциях против аутоантигенов островковых клеток, однако данные реакции можно отнести к «поздней» или «деструктивной» фазе аутоиммунного инсулита [T.P. Diloranzo, 1998]. На более ранних стадиях CD4+- лимфоциты и макрофаги, привлеченные в островки, начинают активно синтезировать IFN- $\gamma$ , который определяет дальнейший характер аутоиммунных реакций в островках. Он привлекает антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые участвуют в презентации антигена [Pavlovic D, van de Winkel M, van der Auwera B, Chen MC, 1997]. IFN- $\gamma$  подавляет функцию клеток Th-2 типа, снижая тем самым выработку



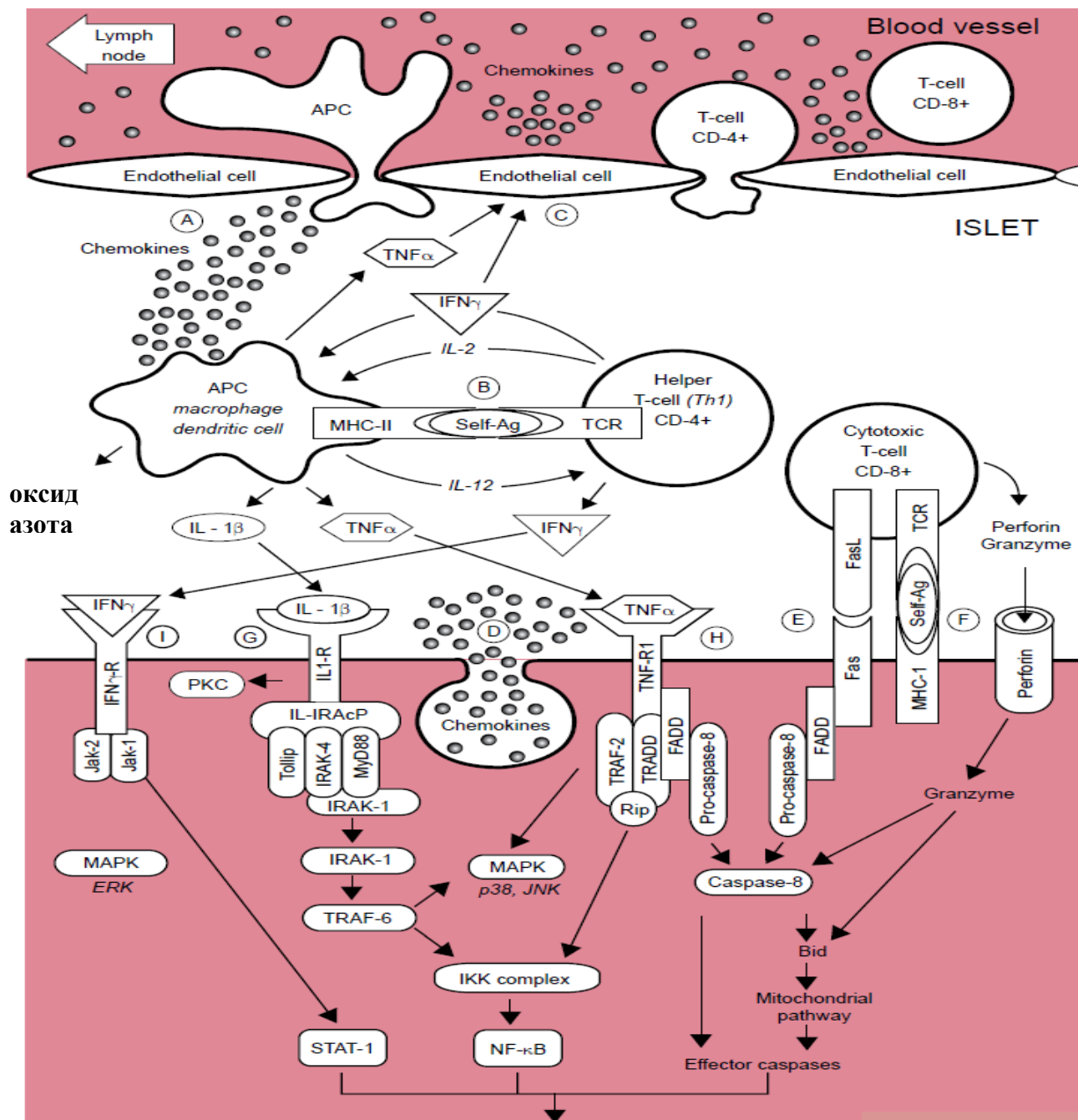
цитокинов, ответственных за активацию В-лимфоцитов [Billiau A., Heremans H., Vermeire K., 1998]. На роль IFN- $\gamma$  в качестве медиатора деструкции  $\beta$ -клеток указывает то, что подавление его синтеза защищает мышей линии NOD (линия мышей, склонные к развитию сахарного диабета в отсутствие ожирения, Non-Obese Diabetic Mice) от развития аутоиммунного инсулита [Rabinovitch A., 1998; Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W.L., Sorensen O., 1995].

IFN- $\gamma$  относится к плеiotропным провоспалительным цитокинам Th1-профиля. В эксперименте на животных, изолированных островках Лангерганса человека и грызунов было показано, что IFN- $\gamma$  обладает выраженным цитотоксическим действием на инсулинпродуцирующие клетки, особенно - при совместном его применении с IL-1 или TNF- $\alpha$  [Chen M., 2005; Storling I., 2005; Bruun C., 2009].

Некоторые авторы [Kukreja A., Cost G., Marker J., 2002; Kukreja A., Maclaren N. K., 1999] сообщают о сниженном уровне продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарными лейкоцитами крови (особенно CD3+клетками) после их стимуляции митогенами у больных с впервые выявленным СД типа 1 и аутоантител-положительных пациентов. При проточно-цитометрическом определении интрацеллюлярного содержания IFN- $\gamma$  в CD4+- и CD8+-лимфоцитах у больных СД типа 1 было обнаружено значительное уменьшение количества клеток, содержащих IFN- $\gamma$  по сравнению с контролем и лицами из группы риска. Этот феномен объясняют двояко: как уходом CD4+- и CD8+-популяций лимфоцитов в очаг воспаления, так и тем, что сниженное образование IFN- $\gamma$  в организме делает  $\beta$ -клетки более чувствительными к вирусным инфекциям, вызывающим их деструкцию [Avanzini M.A., Ciardelli L., Lenta E., 2005].

В нашем исследовании отмечено повышение базальной продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарными лейкоцитами крови у всех пациентов с СД; достоверных различий между подгруппами пациентов с СД зарегистрировано не было. Митоген-стимулированная продукция у всех

пациентов с СД также достоверно отличалась от контрольных значений в сторону уменьшения, без существенных различий между подгруппами пациентов с разным фенотипом СД (табл. 20).



**Рис. 26.** Схема эффекторной фазы аутоиммунного процесса против  $\beta$ -клетки, включающая антигенпрезентирующую клетку (APC), CD4+ (хелперные) и CD8+ (цитотоксические) T-клетки и внутриклеточный каскад реакций, приводящий к апоптозу  $\beta$ -клетки.

Таблица 21

Базальная и ФГА-стимулированная продукция цитокинов Th1-профиля (IL-2, IFN- $\gamma$ ) мононуклеарными лейкоцитами и количество CD25<sup>+</sup>-несущих лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом, Me(Q1 – Q3)

Показатели	Здоровые n=30	LADA n=31	СД1 n=37	СД2 n=67
<b>Продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами и количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных сахарным диабетом</b>				
Базальная продукция IL-2, пг/мл	16,3 (7,8 - 22,0)	105,1 (0,0 - 124,1) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	44,5 (9,1 - 145,3) <b>p<sub>1</sub>=0,03</b> p <sub>2</sub> =0,68	99,6 (18,2 - 123,5) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,84 p <sub>3</sub> =0,51
ФГА-стимулирован-ная продукция IL-2, пг/мл	19,2 (7,8 - 24,8)	98,4 (85,2 - 149,6) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	84,3 (0,0 - 176,2) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,59	96,5 (0,0 - 123,8) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,33 p <sub>3</sub> =0,80
CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	23,9 (21,6 - 29,2)	23,1 (18,9 - 29,2) p <sub>1</sub> =0,63	27,9 (21,9–31,7) p <sub>1</sub> =0,61 p <sub>2</sub> =0,97	29,5 (23,2–34,1) <b>p<sub>1</sub>=0,01</b> <b>p<sub>2</sub>=0,02</b> p <sub>3</sub> =0,65
CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,45 (0,41 - 0,55)	0,45 (0,30 - 0,60) p <sub>1</sub> =0,23	0,46 (0,34 - 0,60) p <sub>1</sub> =0,57 p <sub>2</sub> =0,17	0,58 (0,44 - 0,67) p <sub>1</sub> =0,06 <b>p<sub>2</sub>=0,01</b> p <sub>3</sub> =0,40
<b>Продукция IFN-<math>\gamma</math> мононуклеарными лейкоцитами крови у больных сахарным диабетом</b>				
Базальная продукция IFN- $\gamma$ , пг/мл	0,0 (0,0 - 20,0)	33,6 (31,9 - 36,2) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	32,3 (30,1 - 44,1) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,86	35,5 (32,6 - 56,2) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,27 p <sub>3</sub> =0,33
ФГА-стимулирован-ная продукция IFN- $\gamma$ , пг/мл	820,0 (130,0 - 5350,0)	33,2 (32,6 - 37,0) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	34,1 (29,1 - 48,7) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =1,00	35,6 (31,7 - 53,4) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,61 p <sub>3</sub> =0,46

**Примечание:** p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости отличия значений показателей по сравнению с таковыми у здоровых доноров, p<sub>2</sub> - у больных LADA, p<sub>3</sub> – у пациентов с СД1(критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферонни); Me – медиана, n –объем выборки.

Основной биологический эффект IL-2 заключается в регуляции пролиферации клеток-мишеней, с которыми он взаимодействует: Т- и В-

лимфоциты, NK-клетки, моноциты, макрофаги. Первоначальным эффектом IL-2 является его взаимодействие с CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами, что в дальнейшем приводит к формированию клонов Т-хелперов 1 типа. После получения активирующего сигнала в Th1-лимфоцитах начинают экспрессироваться гены IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha/\beta$ . Оказывая аутокринное воздействие на Th1-клетки и паракринное на субпопуляцию Th2, IL-2 вызывает смещение Th1/Th2 баланса в сторону Th1-ответа. После первичного иммунного ответа IL-2 способствует формированию популяции Т-клеток памяти.

IL-2 стимулирует также клеточное деление не только CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, но и CD8<sup>+</sup>-Т-цитотоксических лимфоцитов, действуя по аутокринному и паракринному типам регуляции. В CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитах под действием IL-2 происходит активация экспрессии генов, отвечающих за синтез перфоринов и гранзимов, что в конечном итоге приводит к усилению цитотоксических свойств лимфоцитов, в В-лимфоцитах – стимуляция синтеза антител.

Известно, что повышение уровня IL-2 в периферической крови, а также его продукции мононуклеарными лейкоцитами крови, регистрировалось у лиц, недавно заболевших СД типа 1, а также у детей с нормогликемией из группы риска с отягощенной наследственностью [Rapaport M.J., Bistritzer T., Aharoni D., 2005], особенно - носителей аутоантител к антигенам  $\beta$ -клеток [Richiusa P, Pizzolanti G, Misiano G, Mattina A, 2004]. С другой стороны, имеются работы, в которых сообщается о снижении уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарными лейкоцитами у больных с СД типа 1 [Tomoda T., Kurashige T., Taniguchi T, 1994].

Согласно нашим данным, базальная и стимулированная продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами превышала контрольные значения во всех группах пациентов с СД ( $p < 0,01$ ). Причем базальная продукция IL-2 превышала контрольные значения многократно, резерв стимуляции

мононуклеарных лейкоцитов был сохранен только в группе пациентов с СД 1 (2-кратный прирост продукции цитокина). По уровню базальной и ФГА – стимулированной продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови достоверных различий между подгруппами пациентов с СД не отмечалось (табл. 21).

Активация зрелых покоящихся Т-лимфоцитов специфическим антигеном приводит к быстрой индукции синтеза и секреции IL-2 и экспрессии его мембранных рецепторов. Следующее вслед за этим взаимодействие IL-2 со своим высокоаффинным рецептором ведет к клональной экспансии антиген-специфичных эффекторных Т-лимфоцитов. Элиминация вызвавшего активацию лимфоцитов антигена приводит к снижению синтеза IL-2 и экспрессии его рецепторов и к затуханию пролиферативного ответа. Таким образом, повышение продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами во всех группах с сахарным диабетом отражает неспецифическую антиген-зависимую стимуляцию Т-клеточного звена иммунитета, связанную вероятно, со сниженными показателями неспецифического иммунитета при СД. Тем не менее, необходимо отметить и предуготованность к IL-2-зависимой пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>-цитотоксических, NK-клеток) у пациентов, как с аутоиммунным сахарным диабетом, так и при СД 2 типа.

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

Осуществление иммунологических эффектов цитокинов зависит также от экспрессии комплементарных им рецепторов на цитоплазматической мембране иммуноцитов. Обращает на себя внимание факт наличия максимального количества МК, несущих рецепторы к IL-2(CD25<sup>+</sup>) у пациентов с СД 2, достоверно отличающий эту группу как от группы контроля, так и от пациентов с LADA (табл. 21). Показатель

экспрессии CD25<sup>+</sup> связан прямой корреляционной связью с такими клиническими параметрами как: возраст пациентов ( $r = 0,31$ ,  $p=0,04$ ), возраст пациентов к моменту манифестации заболевания ( $r = 0,29$ ,  $p=0,047$ ), концентрация общего холестерина сыворотки ( $r = 0,40$ ,  $p=0,009$ ), а также количеством CD4<sup>+</sup> лимфоцитов ( $r = 0,36$ ,  $p=0,009$ ). Таким образом, отмечается зависимость экспрессии CD25<sup>+</sup> как с СД 2 типа, так и его клиничко-метаболическими маркерами.

Проведенный анализ секреции IL-2 и количества МК, несущих комплементарные рецепторы, среди пациентов СД без поздних осложнений и наличием микроангиопатий, дал следующие результаты.

Исследование состояния системы IL-2 у пациентов с манифестным СД1 (без микрососудистых осложнений) показало, что продукция цитокина в данной группе пациентов была выше, чем у здоровых доноров ( $p=0,04$ ), но снижена относительно группы сравнения (СД2 без микрососудистых осложнений) ( $p=0,001$ ). Важно отметить, что у больных СД2, не имеющих нефро-/ретинопатии, концентрация IL-2 достоверно превышала значения ( $p=0,001$ ) в группе здоровых добровольцев (табл.22).

Сравнение количества лимфоцитов, презентирующих рецепторы к IL-2 между группой СД1 без осложнений и здоровыми донорами, а также между группой СД1 без осложнений и пациентами с СД2 без микрососудистых осложнений не выявило достоверных различий ( $p>0,05$ ) (табл. 22).

Концентрация IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных от пациентов с СД1, имеющих микрососудистые осложнения, превышала содержание цитокина в кондиционных средах мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров ( $p=0,04$ ). Различий в количестве CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов между группой больных СД1 с осложнениями и здоровыми лицами выявлено не было ( $p>0,05$ ) (табл. 22).

Продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами пациентов с СД1, имеющих микрососудистые осложнения, была сопоставима с таковой в группе сравнения (СД2 с осложнениями) ( $p>0,05$ ), в свою очередь, концентрация IL-2 в данной группе сравнения достоверно превышала показатель содержания цитокина у здоровых лиц ( $p=0,003$ ). Количество CD25-несущих лимфоцитов у пациентов с СД1 с микрососудистыми осложнениями не отличалось от содержания их у здоровых доноров и в группе сравнения ( $p>0,05$ ) (табл. 22).

У пациентов с СД1, отягощенным нефро-/ретинопатией, содержание IL-2 в культуральных средах и лимфоцитов в крови, презентирующих рецептор к IL-2 повышалось ( $p=0,045$  и  $p=0,045$ , соответственно) по отношению к аналогичным показателям у пациентов с СД1 без микрососудистых осложнений (табл. 22).

Результаты оценки состояния системы IL-2 у пациентов с LADA показали следующее (табл. 22). При данном варианте аутоиммунного диабета в группе пациентов без микрососудистых осложнений продукция IL-2 мононуклеарными лейкоцитами была в 7,5 раз выше, чем у здоровых лиц ( $p=0,001$ ), в 2 раза превышала значения в группе пациентов с СД1 без микрососудистых осложнений ( $p=0,001$ ), а также оказалась сопоставима с продукцией IL-2 в группе сравнения (СД2 без микрососудистых осложнений) ( $p>0,05$ ). Содержание CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови у больных LADA, не имеющих осложнений, не отличалось от аналогичных значений у здоровых доноров, пациентов с СД1 без осложнений и пациентов группы сравнения ( $p>0,05$ ).

При наличии микрососудистых осложнений у пациентов с LADA показатель концентрации IL-2 увеличивался в 2 раза ( $p=0,003$ ), а количество лимфоцитов, несущих CD25 – в 1,5 раза ( $p=0,03$ ) по сравнению с аналогичными параметрами у больных LADA, не имеющих осложнений (табл. 22).

Таблица 22

Концентрация IL-2 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2 у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом с учетом наличия микрососудистых осложнений (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		IL-2, пг/мл	CD25 <sup>+</sup> -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,31 (7,78-21,99)	23,90 (21,60-37,80)
СД1 (n=37)	Без осложнений (n=18)	65,55 (34,74-80,48) <b>p<sub>1</sub>=0,04</b>	25,60 (21,00-28,90) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b>
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	114,30 (66,26-145,25) <b>p<sub>1</sub>=0,04</b> <b>p<sub>2</sub>=0,045</b>	35,95 (32,10-39,80) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>=0,045</b>
LADA(n=31)	Без осложнений (n=12)	119,36 (105,11-124,11) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> <b>p<sub>2</sub>=0,001</b>	23,10 (19,40-25,65) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	228,87 (183,23-245,11) <b>p<sub>1</sub>=0,017</b> <b>p<sub>3</sub>=0,003</b> <b>p<sub>4</sub>=0,03</b>	34,75 (25,40-41,00) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b> <b>p<sub>3</sub>=0,03</b> <b>p<sub>4</sub>&gt;0,05</b>



Продолжение таблицы 22			
СД2 (n=67)	Без осложнений (n=18)	100,36 (90,40-114,61) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> <b>p<sub>2</sub>=0,001</b> p <sub>3</sub> >0,05	28,80 (22,25-33,70) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
	Наличие микрососудистых осложнений (n=49)	123,54 (117,06-145,57) <b>p<sub>1</sub>=0,003</b> p <sub>4</sub> >0,05 <b>p<sub>5</sub>=0,045</b> p <sub>6</sub> >0,05	29,90 (25,35-35,65) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>4</sub> >0,05 p <sub>5</sub> >0,05 p <sub>6</sub> >0,05

**Примечание:** p<sub>1</sub> – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров; p<sub>2</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 без осложнений; p<sub>3</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA без осложнений; p<sub>4</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 с микрососудистыми осложнениями; p<sub>5</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA с микрососудистыми осложнениями; p<sub>6</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД2 без осложнений; n – количество обследованных лиц

Кроме этого возростала продукция IL-2 при LADA, осложненном нефро-/ретинопатией, относительно аналогичных показателей у здоровых доноров ( $p=0,017$ ), пациентов с СД1, имеющих микрососудистые осложнения ( $p=0,03$ ), а также группы сравнения (СД2 с микрососудистыми осложнениями) ( $p=0,045$ ). Однако, достоверных различий в количестве CD25<sup>+</sup>-презентирующих лимфоцитов между рассматриваемыми группами обнаружено не было ( $p>0,05$ ) (табл. 22).

При аутоиммунном сахарном диабете каскад гормонально-метаболических изменений (и в первую очередь гипергликемия), связанный с гибелью  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, ведет к развитию тканевой гипоксии и появлению в клинической картине ангиопатий [Chavira-Suarez, E., Sandoval, A., Quintero, H., Bustamante, P., Felix, R., Lamas, M., 2012]. Сопоставление данных о наличии микрососудистых осложнений, сроках их развития и функциональном состоянии  $\beta$ -клеток поджелудочной железы подчеркивает, что падение концентрации С-пептида в крови после 4-го года течения заболевания при LADA (аналогично СД2) ассоциировано с наличием диабетических микроангиопатий (табл. 14,15). Ряд исследований последних лет указывает на ангиопротективные свойства С-пептида [Maciejwska-Jeske M., Szczesna A., Meczekalski B., 2011; Vasic D., Spyralantis A., Durst R., Bach H., Vogt S., Rottbauer W. et al., 2012], проявляющиеся в защите клеток от глюкозоиндуцированного апоптоза и стимуляции их пролиферации [Li Z., Zhang W., Sima A., 2003]. Поэтому резкое снижение концентрации С-пептида при LADA способствует развитию диабетических микрососудистых осложнений. В то же время данный факт не в полной мере объясняет разницу между клинической тяжестью течения микрососудистых осложнений при LADA и СД1.

По данным литературы известно, что при диабете в условиях гипергликемии и окислительного стресса активируются сигнальные системы, регулирующие экспрессию генов провоспалительных цитокинов

[Evans J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2003; Yadav U.C., Srivastava S.K., Ramana K.V., 2010]. Результаты исследования иммунологического компонента патогенеза заболевания показывают, что развитие микрососудистых осложнений при LADA происходит на фоне значительно повышенного уровня продукции иммунными клетками цитокинов с иммунорегуляторными и цитотоксическими свойствами (IL2, IL4, TNF- $\alpha$ ). Подобная наработка цитокинов свидетельствует о большей выраженности воспалительных реакций при LADA (чем при СД1), оказывающих влияние на развитие микроангиопатий. В сочетании с резким снижением секреции С-пептида и уровня инсулина [Maciejwska-Jeske M., Szczesna A., Meczekalski B., 2011; Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M., 2003] подобная цитокин-секретирующая активность иммунных клеток указывает на существование комплекса иммунно-метаболических особенностей развития LADA, определяющих темпы формирования и клиническую выраженность эндотелиальной дисфункции.

Существует понятие о нарушении баланса между Th-клонами, гиперактивации Th2 из-за недостатка IL-2, и развитии патологии, связанной с несбалансированной активацией гуморального иммунитета, однако более детальный анализ показывает, что воспалительные и аутоиммунные реакции у дефицитных по IL-2 животных невозможно объяснить только повышенной активацией Th2. В настоящее время считается, что описанные аутоиммунные заболевания связаны с нарушением функционирования T-регуляторных лимфоцитов. Treg синтезируют IL-10 и TGF- $\beta$ , цитокины с широким спектром иммуносупрессивной активности, которые, видимо, принимают участие в реализации биологических свойств T-reg. Для поддержания популяции T-reg на периферии требуется IL-2, продуцируемый активированными CD4<sup>+</sup> T-хелперами. Таким путем, может формироваться петля отрицательной обратной связи в регуляции числа как T-reg, так и числа Th-лимфоцитов на периферии. Вследствие этого, одна из

главных функций IL-2 в организме связана с формированием пула CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторных лимфоцитов, регулирующих функции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов хелперов, при этом альфа-цепь рецептора IL-2 абсолютно необходима для дифференцировки Т-reg, а IL-2 важен для поддержания их количества.

Обобщая все вышеизложенное, касательно роли IL-2 в иммунопатогенезе аутоиммунного СД, представляется его роль двояко – увеличение количества продуцирующих IL-2 Th1 лимфоцитов, инфильтрирующих паренхиму островков Лангерганса, приведет к пролиферации и дифференцировке CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, пополняя пул цитотоксических Т-лимфоцитов и клеточно-опосредованной деструкции инсулин-продуцирующей ткани, с другой стороны – дефицит IL-2 и нарушение его рецепции, отразится на пролиферации, дифференцировке и поддержания пула Treg в циркуляции.

Полученные в исследовании корреляционные связи между увеличением продукции IL-2 МК и сохранением более высокого уровня эндогенной секреции инсулина (С-пептида) и количеством клеток, несущих CD25<sup>+</sup> и количеством CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов хелперов, подтверждают ранее полученные данные и доказывают исключительную роль IL-2 и его рецептора преимущественно в ограничении скорости цитотоксических клеточных реакции в островке Лангерганса, сохранении эндогенной секреции инсулина при LADA, и данные эффекты IL-2 реализуются за счет модуляции количества и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов хелперов.

### **Заключение**

Продукция IL-2 является индуцибельной, вследствие этого повышение его продукции во всех группах пациентов с сахарным диабетом отражает степень активации Т-клеточного звена иммунитета. Максимальный резерв антиген - и митоген-индуцированной продукции IL-2, регистрировался в

группе пациентов с сахарным диабетом 1 типа, минимальный - в группе пациентов с LADA и сахарным диабетом 2 типа, что может приводить к нарушению формирования пула  $CD4^+CD25^+$  Т-регуляторных лимфоцитов и поддержания их количества в циркуляции. Повышение количества лимфоцитов, несущих рецепторы к IL-2 при сахарном диабете 2 типа отражает состояние антиген-индуцированной активации Т-клеточного звена иммунитета и ассоциировано с клиническими и метаболическими маркерами сахарного диабета 2 типа.

Данное исследование показывает, что кроме метаболических сдвигов, связанных с резким падением концентрации С-пептида после 4-го года течения заболевания, раннему развитию микрососудистых осложнений при LADA сопутствуют иммунологические изменения, в частности повышенная продукция мононуклеарными лейкоцитами цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ . Это, по нашему мнению, отражает отличные от СД1 аспекты развития микроангиопатий при LADA. Данные результаты дополнительно указывают на необходимость учета LADA в классификации сахарного диабета, как отдельного варианта аутоиммунного диабета, с последующей оптимизацией терапевтических подходов, направленных на сдерживание каскада гормонально-метаболических и иммунологических изменений, провоцирующих появление в клинической картине ангиопатий.

### **3.6.2. Секретция *in vitro* цитокинов Th2-профиля (IL-4, IL-10) и количество CD124<sup>+</sup>-, CD210<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

К цитокинам Th2-профиля относится интерлейкин 4 (IL-4), который продуцируется преимущественно Т-лимфоцитами. Кроме того, ограниченная способность к выработке IL-4 была обнаружена у тучных клеток, базофилов, В-лимфоцитов и стромальных клеток костного мозга [И.С. Фрейдлин, 1998].

Этот интерлейкин способствует формированию «толерантного Th2 - фенотипа», привлекая В-лимфоциты в качестве «непрофессиональных» антиген-представляющих клеток, которые стимулируют развитие анергии в большей мере, чем активации. Снижая экспрессию Fc-рецепторов на мембране макрофагов, IL-4 угнетает антитело-зависимую цитотоксичность и антитело-зависимый фагоцитоз [Aral, K., 1990]. Более того, IL-4 ингибирует освобождение активированными макрофагами провоспалительных молекул (интерлейкин-1, фактор некроза опухолей- $\alpha$ , интерлейкин-8, простагландин E<sub>2</sub> и др.). Результатом продукции Th2-лимфоцитами IL-4 является подавление дифференцировки Th1-лимфоцитов [Ярилин, А.А., 1997].

Высокоаффинный рецептор IL-4 представляет собой комплекс, состоящий из двух субъединиц: б-субъединицы, связывающей IL-4 с высоким сродством и г-субъединицы, вносящей дополнительный вклад в связывание. б-цепь IL-4R входит в семейство цитокиновых рецепторов [Deichmann, K., 1997]. Растворимая форма IL-4R образуется в результате альтернативного сплайсинга. IL-4R экспрессируется в незначительном количестве на пре-В клетках, неактивированных зрелых Т- и В-лимфоцитах. Активация клеток приводит к увеличению на их мембране роста числа IL-4R [Хаитов Р.М., 2000].

По данным литературы, IL-4 проявляет защитное действие при моделировании аутоиммунного диабета у грызунов [Kukreja A., Maclaren N. K., 1999]. Сведения относительно содержания этого цитокина в периферической крови у пациентов с СД типа 1 и их сибсов, базальной и стимулированной фитогемагглютинином (ФГА) продукции мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* крайне противоречивы. Одни авторы определяли более низкий его уровень [Попова В. В., Мельниченко С. В., Малиновская Т. Н., 2004; Karlsson M. G., Lawesson S.S., Ludvigsson J., 2000], другие - не находили отличия от контрольной группы [Leech N. J., Elsegood K. A., Narendran P., 1999], третьи - отмечали даже его повышение в дебюте СД типа 1 [Rapaport M.J., Bistritzer T., Aharoni D., 2005].

Из всего вышеизложенного можно сделать вывод, что IL-4 может играть протективную роль на темпы развития деструктивного инсулита при аутоиммунном сахарном диабете и возможно, одну из ключевых позиций занимать в иммунопатогенезе LADA. Одним из подтверждений данного мнения является также то, что при преинкубации IL-4 с островковыми клетками поджелудочной железы человека полностью предотвращается апоптоз, вызываемый «коктейлем», состоящим из IL-1 + TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  [Santangelo, C, 2001], а у лиц с СД1 в доклиническую фазу выявлялось снижение IL-4-зависимого антителообразования в поствакцинальном периоде [Schmid, S., 2002].

В проведенном нами исследовании отмечена тенденция к более высокой базальной продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-4 у больных LADA и СД2 по сравнению с пациентами с СД1. ФГА-стимулированная продукция IL-4 при LADA и СД 2 также достоверно выше, чем при СД типа 1 (табл. 23). Это, вероятно, отражает патогенетические особенности функционирования Т-звена иммунной системы при LADA, отличные от механизмов развития СД1, и определяющие медленное

повреждение  $\beta$ -клеток при этом заболевании, что фенотипически приближает LADA к СД типа 2.

Таблица 23

Базальная и ФГА-стимулированная продукция цитокинов Th2-профиля (IL-4 и IL-10) мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с сахарным диабетом, Me (Q1 – Q3)

Показатели	Здоровые n=30	LADA n=31	СД1 n=37	СД2 n=67
<b>Продукция IL-4 мононуклеарными лейкоцитами и количество CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов</b>				
Базальная секреция IL-4, пг/мл	16,1 (14,9; 17,7)	32,1 (25,6;36,7) <b>p<sub>1</sub>=0,04</b>	14,0 (0,0;71,6) p <sub>1</sub> =0,72 p <sub>2</sub> =0,30	34,5 (17,9;40,4) <b>p<sub>1</sub>=0,02</b> p <sub>2</sub> =0,93 p <sub>3</sub> =0,40
ФГА-стимулированная секреция IL-4, пг/мл	16,6 (15,6; 18,0)	29,4 (14,8;32,8) p <sub>1</sub> =0,14	9,0 (7,7;17,9) p <sub>1</sub> =0,22 <b>p<sub>2</sub>=0,04</b>	29,5 (17,7;38,3) <b>p<sub>1</sub>=0,03</b> p <sub>2</sub> =0,82 p <sub>3</sub> =0,06
IL-4R $\alpha$ +-лимфоциты, %	4,2 (2,1; 4,5)	7,6 (6,1; 8,6) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	10,9 (7,8; 15,7) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> <b>p<sub>2</sub>=0,04</b>	10,6 (6,3; 12,5) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,26 p <sub>3</sub> =0,47
CD124 <sup>+</sup> -лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,08 (0,04; 0,09)	0,14 (0,10;0,16) <b>p<sub>1</sub>=0,02</b>	0,21 (0,15;0,28) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> <b>p<sub>2</sub>=0,01</b>	0,17 (0,12;0,25) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,07 p <sub>3</sub> =0,27
<b>Продукция IL-10 мононуклеарными лейкоцитами и число CD210<sup>+</sup>-лимфоцитов</b>				
Базальная секреция IL-10, пг/мл	6,0 (0,0; 50,0)	383,1 (50,0;733,1) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	100,0 (0,0;1837,7) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,85	605,1 (194,9;2077,0) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,43 p <sub>3</sub> =0,35



ФГА- стимулирован- ная секреция IL-10, пг/мл	40,0 (7,0;130,0)	194,9 (50,0 - 1183,4) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	100,0 (0,0 - 1408,4) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,92	400,0 (0,0 - 1014,0) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,73 p <sub>3</sub> =0,67
IL-10R+- лимфоциты, %	5,0 (3,3 – 7,2)	8,7 (7,3 - 9,6) p <sub>1</sub> =0,05	7,3 (7,0 - 8,7) p <sub>1</sub> =0,14 p <sub>2</sub> =0,63	7,6 (6,1 - 7,9) p <sub>1</sub> =0,3 p <sub>2</sub> =0,27 p <sub>3</sub> =0,47
IL-10R+- лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,10 (0,07 – 0,11)	0,14 (0,13 - 0,16) p <sub>1</sub> =0,09	0,16 (0,14 - 0,17) p <sub>2</sub> =0,23	0,15 (0,12 - 0,15) p <sub>2</sub> =0,72 p <sub>3</sub> =0,27

**Примечание:** p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости отличия значений показателей по сравнению с таковыми у здоровых доноров, p<sub>2</sub> - у больных LADA, p<sub>3</sub> – у пациентов с СД1 (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферонни); Me – медиана, n – объем выборки.

Тем не менее количество CD124<sup>+</sup>лимфоцитов в группе с LADA хоть и превышало контрольные значения, но было достоверно меньшим в сравнении с пациентами с СД1 и СД2 (табл. 23).

При развитии поздних сосудистых осложнений появлялись следующие характеристики этой системы. В культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов крови пациентов с СД1, не имеющих микрососудистых осложнений, концентрация IL-4 была сопоставима с таковой в группе здоровых доноров (p>0,05) и снижена относительно группы больных СД2 без микрососудистых осложнений (p=0,04). В тоже время количество лимфоцитов, презентующих рецепторы к IL-4 увеличивалось относительно данного показателя у здоровых лиц (p=0,004) и не изменялось по отношению к группе сравнения (СД 2 без микрососудистых осложнений) (p>0,05). Необходимо отметить, что содержание IL-4 в культуральной среде и количество CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с СД2 без осложнений было повышено (p=0,03 и p=0,025, соответственно) в сравнении со здоровыми донорами (табл. 24).

Продукция IL-4 у пациентов с СД1, имеющих микрососудистые осложнения, не отличалась от продукции цитокина у здоровых лиц, больных СД1 без микрососудистых осложнений и пациентов группы сравнения (СД2 с микрососудистыми осложнениями) ( $p>0,05$ ) (табл. 24). Количество CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов при СД1 с осложнениями увеличивалось по сравнению со значением данного показателя в группе здоровых добровольцев ( $p=0,004$ ) и больных СД2, имеющих микрососудистые осложнения ( $p=0,009$ ). В свою очередь, содержание в крови лимфоцитов, несущих CD124, в группе СД2 с микрососудистыми осложнениями (как и при СД1 с осложнениями) было достоверно выше ( $p=0,027$ ), чем у здоровых лиц. Количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4 у пациентов с СД1, имеющих микрососудистые осложнения, не изменялось относительно их количества в группе больных СД1 без осложнений ( $p>0,05$ ) (табл. 24).

Таблица 24

Концентрация IL-4 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4 у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом с учетом наличия микрососудистых осложнений (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		IL-4, пг/мл	CD124 <sup>+</sup> -лимфоциты, %
Здоровые доноры (n=30)		16,09 (14,92-17,72)	4,40 (3,80-4,50)
СД1 (n=37)	Без осложнений (n=18)	15,79 (13,22-18,90) $p_1 > 0,05$	10,10 (7,80-11,90) $p_1 = 0,004$
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	17,93 (13,97-44,79) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	10,90 (10,70-11,10) $p_1 = 0,004$ $p_2 > 0,05$
LADA(n=31)	Без осложнений (n=12)	31,31 (14,00-32,36) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	7,40 (6,65-8,00) $p_1 = 0,045$ $p_2 > 0,05$
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	116,41 (98,34-131,23) $p_1 = 0,03$ $p_3 = 0,007$ $p_4 = 0,045$	12,45 (9,20-15,55) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,007$ $p_4 > 0,05$

Продолжение таблицы 24			
СД2 (n=67)	Без осложнений (n=18)	32,73 (17,93-37,72) <b>p<sub>1</sub>=0,03</b> <b>p<sub>2</sub>=0,045</b> p <sub>3</sub> >0,05	10,80 (8,00-12,85) <b>p<sub>1</sub>=0,025</b> p <sub>2</sub> >0,05 <b>p<sub>3</sub>=0,043</b>
	Наличие микрососудистых осложнений (n=49)	34,33 (14,92-64,37) <b>p<sub>1</sub>=0,05</b> p <sub>4</sub> >0,05 <b>p<sub>5</sub>=0,037</b> p <sub>6</sub> >0,05	6,30 (5,20-9,25) <b>p<sub>1</sub>=0,027</b> <b>p<sub>4</sub>=0,009</b> <b>p<sub>5</sub>=0,045</b> <b>p<sub>6</sub>=0,03</b>

**Примечание:** p<sub>1</sub> – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров; p<sub>2</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 без осложнений; p<sub>3</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA без осложнений; p<sub>4</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 с микрососудистыми осложнениями; p<sub>5</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA с микрососудистыми осложнениями; p<sub>6</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД2 без осложнений; n – количество обследованных лиц.

Оценивая состояние системы IL-4 при LADA, установили, что у пациентов с данным вариантом диабета, не имеющих микрососудистых осложнений, содержание цитокина в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов не отличается от его концентрации в культуральных средах здоровых доноров, группы сравнения (СД2 без осложнений) и группы СД1 не имеющих микрососудистых осложнений ( $p>0,05$ ). Количество лимфоцитов, несущих рецепторы к IL-4, у пациентов с LADA без нефро- и ретинопатии было выше ( $p=0,04$ ), чем их содержание в крови у здоровых лиц, но ниже значения данного показателя в группе сравнения ( $p=0,04$ ). Достоверных отличий в количестве CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов между группами пациентов с LADA и СД1 (не имеющих микрососудистых осложнений) выявлено не было ( $p>0,05$ ) (табл. 24).

При LADA, осложненном нефро-/ретинопатией результаты определения концентрации IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и презентации рецептора к IL-4 лимфоцитами, показали повышение значений данных показателей по сравнению с группой здоровых лиц ( $p=0,03$  и  $p=0,031$ , соответственно). Кроме того, содержание цитокина в культуральных средах и количество CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с LADA, имеющих осложнения, достоверно превышало показатели в группе сравнения (СД2 с микрососудистыми осложнениями) ( $p=0,037$  и  $p=0,045$ , соответственно) (табл.24). В рассматриваемой группе пациентов продукция IL-4 в 3,5 раза превысила значение в группе LADA без микрососудистых осложнений ( $p=0,007$ ) и в 7 раз – в группе СД1, осложненной нефро-/ретинопатией ( $p=0,045$ ). При этом количество лимфоцитов, презентующих CD124, увеличивалось по сравнению с данным показателем у пациентов с LADA без микрососудистых осложнений ( $p=0,007$ ) и не изменялось относительно группы больных СД1, имеющих осложнения ( $p>0,05$ ) (табл. 24).

Интерлейкин 10 - лимфокин с молекулярной массой около 19 кДа, продуцируемый Th-2 CD4<sup>+</sup>-клетками. У человека главным источником образования IL-10 являются CD4<sup>+</sup>-клетки (как Th1, так и Th2), макрофаги, тимоциты, В-лимфоциты, тучные клетки и кератиноциты [Возианов А.Ф., 1998; Rabinovitch, A., 2003]. Он тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, подавляет продукцию IFN- $\gamma$  Th-1 CD4<sup>+</sup>-клетками, секрецию активированными макрофагами IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 и IFN- $\gamma$ . В своем ингибирующем действии на клеточное звено иммунной системы IL-10 синергичен с IL-4 [Bonato V., Dionisi S., Vendrame F., 2005].

Этот цитокин ингибирует генерацию Th1-лимфоцитов в регионарных лимфоузлах, подавляет их активность, препятствует формированию гранулемы и тем самым способствует диссеминации инфекции. Таким образом, IL-10 рассматривают как универсальный для всех Th-лимфоцитов супрессирующий цитокин [Bonato V., Dionisi S., Vendrame F., 2005].

По данным литературы, большинство авторов считают IL-10 цитокином, оказывающим защитное действие в отношении развития СД типа 1 [Balasa B., Van Gunst K., Jung N., 2000; Balashov K.E., 2000; Bonato V., Dionisi S., Vendrame F., 2005]. У больных с впервые выявленным СД типа 1 отмечается значительное снижение его секреции мононуклеарными лейкоцитами крови [Leech N. J., Elsegood K. A., Narendran P., 1999; Rapaport M.J., Bistritzer T., Aharoni D., 2005], в том числе, после введения адреналина. В то же время есть работы, в которых на основании исследования ЕК-Т-клеток у NOD-мышей, не было обнаружено противодиабетического действия IL-10, в отличие от IL-4 [Mi, Q.S., 2004].

При исследовании уровня циркулирующего IL-10 в сыворотке крови больных детей с впервые выявленным СД 1 типа по одним данным [Hussain, M.J., 1996] не отмечалось изменения его уровня в крови сравнению со здоровыми детьми того же возраста. По другим данным [Mysliwska, J., 2004]

циркулирующий IL-10 выявлялся в крови у 3 из 30 здоровых детей, а у больных — у 11 из 30.

Обобщая данные литературы, можно прийти к заключению, что при предиабете и у детей более часто наблюдается снижение секреции IL-10 мононуклеарами крови. Изменение уровня циркулирующего IL-10 менее закономерно, что, видимо, обусловлено влиянием на него ряда других факторов [Попова В. В., Мельниченко С. В., Малиновская Т. Н., 2004].

При оценке базальной продукции IL-10 установлены достоверно более высокие его содержание в супернатантах у пациентов, страдающих СД типа 2, затем - при LADA, и наименьшие - у больных СД типа 1 (табл. 23).

Наиболее высокий уровень ФГА-стимулированной продукции IL-10 отмечался у пациентов, страдающих LADA и СД типа 2, минимальные — также у больных СД типа 1. Высокий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при LADA свидетельствует о повышении супрессорной активности мононуклеарных лейкоцитов, которая, возможно, имеет протективное значение в отношении аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток и в совокупности с другими иммунологическими факторами, детерминирует постепенное развитие клинических симптомов инсулиновой недостаточности. Напротив, низкий уровень базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-10 при СД типа 1 свидетельствует в пользу большей Th-1 поляризации иммунного ответа при данном клиническом варианте аутоиммунного диабета.

Таким образом, обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, можно прийти к заключению, что продукция различных видов цитокинов во многом определяет развитие и клинические особенности аутоиммунного СД. Цитокины Th1-типа активируют реакции клеточного иммунитета, т.е. цитотоксические и воспалительные реакции. Усиление реакций с участием цитокинов Th1-профиля приводит к возникновению органоспецифических аутоиммунных заболеваний. При

таком условии развитие гуморального ответа является антагонистическим путем, подавляющим активность цитотоксических реакций со стороны Т-клеток в островках Лангерганса. Вследствие особенностей цитокинопосредованных клеточных взаимодействий при LADA потеря функциональной паренхимы и манифестация инсулиновой недостаточности развивается медленно, растягиваясь на годы.

### **3.6.3. Состояние системы «лиганд-рецептор»TNF- $\alpha$ у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

Являясь типичным провоспалительным цитокином, играющим ключевую роль в регуляции интенсивности воспаления и эффективности иммунной защиты, TNF- $\alpha$  относится к маркерам неспецифического генерализованного воспаления. Он обладает многочисленными иммуномодулирующими эффектами, которые имеют фундаментальное значение в патогенезе аутоиммунного воспаления. В настоящее время существуют данные о том, что TNF- $\alpha$  обладает способностью стимулировать пролиферацию аутореактивных лимфоцитов различных классов, вызывать абберантную экспрессию молекул адгезии и антигенов гистосовместимости (HLA) II класса на поверхности панкреатических клеток, что может приводить к нарушению процессов распознавания антигенов и сопутствовать развитию аутоиммунного инсулита [Uno S., Imagawa A., Okita K. et al., 2007; Schütze S., Tchikov V., Schneider-Brachert W., 2008]. Кроме того, одним из ключевых биологических свойств TNF- $\alpha$  является его участие в рецепторном пути апоптоза иммунокомпетентных клеток [Bruun C., Heding P.E., Ronn S.G., 2009].

На сегодняшний день накоплен ряд данных, касающихся исследования действия TNF- $\alpha$  на изолированные клетки островков Лангерганса *in vitro*. Показано, что TNF- $\alpha$  является цитокином, индуцирующим апоптоз инсулинпродуцирующих клеток [Bruun C., Heding P.E., Ronn S.G., 2009]. Наиболее выражена гибель  $\beta$ -клеток поджелудочной



железы при совместном действии TNF- $\alpha$  с IL-1 и IFN- $\gamma$ . Этот эффект опосредуется цитокин-индуцированным снижением экспрессии генов, участвующих в поддержании роста и регенерации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [Ortis F., Pirot P., Naamane N. et al., 2008; Ortis F., Naamane N., Flamez D. et al., 2010].

Проведение сигнала от TNF- $\alpha$  в клетки-мишени осуществляется через рецепторы (TNF-R), которые представлены как мембранносвязанными, так и растворимыми формами. Данная сигнализация является чрезвычайно сложной, может приводить к гибели или выживанию клеток. Результаты исследований свидетельствуют о важной роли взаимодействий рецепторов к TNF- $\alpha$  со специфическими лигандами в регуляции функционирования иммунокомпетентных клеток и инсулинпродуцирующих клеток поджелудочной железы [Ihnatko R., Kubes M., 2007; Margolles-Clark E., Kenyon N.S., Ricordi C. et al., 2010].

TNF-RI конститутивно экспрессируется в большинстве тканей, в то время как экспрессия TNF-R2 жестко регламентируется и обычно встречается в клетках иммунной системы. У подавляющего большинства клеток, TNF-RI, по-видимому, является ключевым медиатором проведения сигнала TNF, тогда как в лимфоидной системе TNF-R2, видимо, играют более важную роль [Grell M, Douni E, Wajant H et al., 1995]. Важность TNF-R2 не следует недооценивать, потому что этот рецептор может быть полностью активирован только членами семейства TNF, но не sTNF [Grell M, Wajant H, Zimmermann G and Scheurich P, 1998]. Причины этих различий до конца не изучены, но различная стабильность комплекса лиганд/рецептор может способствовать этому феномену. Внеклеточная область обоих рецепторов может быть подвергнута протеолитическому шеддингу, мобилизуя растворимые фрагменты рецептора с потенциально нейтрализующим эффектом [Wallach D, Engelmann H, Nophar Y et al., 1991].

Изучению уровня продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови и состояния его рецепторного аппарата при различных вариантах сахарного диабета аутоиммунного генеза посвящено достаточное количество работ. Показано, что у многих больных сахарным диабетом 1 типа повышен уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови [Hussain M.J., Maher J., Warnock T. et al., 1998; Hussain M.J., Peakman M., Gallati H. et al., 1996]. При этом установлено, что концентрация TNF $\beta$  в сыворотке крови резко возрастает на начальных стадиях сахарного диабета 1 типа, а также при развитии микроангиопатий [Doganay S., Evereklioglu C., Er H. et al., 2002; Ben-Mahmud B.M., Chan W.H., Abdulahad R.M. et al., 2006; Ben-Mahmud B.M., Mann G.E., Datti A. et al., 2004]. Некоторыми исследованиями подтверждена ассоциация ухудшения почечных функций (снижение скорости клубочковой фильтрации) с некоторыми компонентами гуморальных систем TNF и Fas, так, например, более сильный эффект на скорость клубочковой фильтрации у диабетиков оказывали sTNF-R1, sTNF-R2 и sFas, нежели возраст или величина альбуминурии [Niewczas M.A., Ficociello L.H., Johnson A.C., Walker W. et al., 2009]. Результаты показывают роль системного воспаления и апоптоза в патогенезе раннего развития нефропатии у пациентов с СД.

Из экспериментальных исследований на NOD мышах известно, что TNF- $\alpha$  играет важную роль в индукции аутоиммунного диабета, поскольку модулирует специфическое диабетогенное созревание дендритных клеток и активацию аутореактивных Т-клеток в региональных лимфатических узлах [Lee LF, Xu B, Michie SA, Beilhack GF et al., 2005].

С другой стороны, система TNF является перспективной для изучения с позиции поиска технологии управления аутоиммунными процессами. Известно, что целью терапии аутоиммунных заболеваний является селективная гибель редких аутореактивных лимфоцитов. Показано, что воздействие TNF способствует гибели аутореактивных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, но

не CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при СД1, так и при других аутоиммунных заболеваниях. Гибель аутореактивных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов также вызывают специфические агонисты TNF-R2, за счет «мимикрии» с TNF-α. Агонисты TNF-R1 не вызывают гибели аутореактивных CD8<sup>+</sup>-клеток у пациентов с СД1. Кроме того, в этом же исследовании было показано, что активированные вирусными белками ЦМВ или ВЭБ CD8<sup>+</sup>-клетки, резистентны к воздействию TNF, что доказывает, что данный механизм специфичен для элиминации только аутореактивных лимфоцитов [Ban L., Zhang J., Wang L., Kuhtreiber W. et al., 2008]. Возможность использования агонистов TNF-R2 для индукции гибели аутореактивных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов является перспективной, поскольку лишена системных токсичных эффектов TNF и показала уже свою хорошую переносимость в экспериментах на человекообразных обезьянах. Это объясняется меньшей распространенностью в организме TNF-R2, нежели TNF-R1, так как TNF-R2 экспрессируют только активированные Т-клетки, эндотелиоциты и некоторые виды нейронов [Ban L., Zhang J., Wang L., Kuhtreiber W. et al., 2008]. Тем не менее, парадоксально, но современные аспекты терапии аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, предусматривают использование анти-TNF терапии, несмотря на ее выраженные системные побочные эффекты [Ban L., Zhang J., Wang L., Kuhtreiber W. et al., 2008].

При оценке состояния системы TNF-α у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета помимо продукции TNF-α культурой мононуклеарных лейкоцитов и количества CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов крови, учитывали содержание в культуральных средах растворимой формы рецептора к TNF-α (sTNF-R1) (табл. 25,26).

Установлено, что спонтанная и стимулированная ФГА продукция TNF-α мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с сахарным диабетом (диабет типа 1, типа 2, LADA) была сопоставима с таковой у

здоровых лиц (табл. 25). Количество лимфоцитов, экспрессирующих комплементарные рецепторы TNF-RI, увеличивалось только у пациентов с LADA и СД2 в сравнении с контрольной группой, различия между собой и в сравнении с СД1 не достигали уровня статистической значимости. При исследовании содержания растворимой формы рецептора типа 1 к TNF- $\alpha$  установлено, что у пациентов с рассматриваемыми вариантами диабета его содержание существенно снижено по отношению к контрольной группе. Наименьшая концентрация sTNF-R1 зафиксирована в группе пациентов, страдающих диабетом типа 1 манифестного течения. Значение данного показателя в группе больных сахарным диабетом типа 1 было также достоверно снижено по сравнению с группой пациентов с LADA (табл. 25).

При развитии диабетических микроангиопатий (нефро-, ретинопатия) изменения продукции изучаемого цитокина изменились следующим образом (табл. 26).

Значения всех рассматриваемых составляющих системы TNF- $\alpha$  у пациентов с СД1, отягощенном нефро-/ретинопатией, были сопоставимы с таковыми у больных СД1, не имеющих осложнений ( $p>0,05$ ) (табл. 26).

У пациентов с LADA были получены следующие результаты (табл. 26). В подгруппе пациентов, не имеющих микрососудистых осложнений содержание TNF- $\alpha$  в культуральной среде не отличалось от данного показателя у здоровых доноров ( $p>0,05$ ). В свою очередь, количество CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови превышало их содержание у здоровых лиц ( $p=0,035$ ), а уровень sTNF-R1 снижался относительно значений в контрольной группе (здоровые доноры,  $p=0,001$ ). Относительно изучаемых показателей системы TNF- $\alpha$  в группе сравнения у пациентов с LADA, не имеющих осложнений, различий не обнаружено ( $p>0,05$ ) (табл. 26).

Таблица 25

Продукция TNF- $\alpha$  и sTNF-R1 мононуклеарными лейкоцитами и количество TNF-R1+-лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатели	Здоровые n=30	LADA n=31	СД1 n=37	СД2 n=67
Базальная продукция TNF- $\alpha$ , пг/мл	47,1 (31,1 - 206,4)	7,7 (3,3-370,5)	13,6 (3,5-28,7)	18,9 (5,0-222,5)
		p <sub>1</sub> =0,64	p <sub>1</sub> =0,08 p <sub>2</sub> =0,87	p <sub>1</sub> =0,37 p <sub>2</sub> =0,89 p <sub>3</sub> =0,46
ФГА-стимулированная продукция TNF- $\alpha$ , пг/мл	73,0 (11,1 - 194,1)	9,9 (3,8-323,4)	11,5 (3,0-25,8)	75,3 (5,9-286,1)
		p <sub>1</sub> =1,00	p <sub>1</sub> =0,39 p <sub>2</sub> =0,81	p <sub>1</sub> =0,87 p <sub>2</sub> =0,60 p <sub>3</sub> =0,24
TNF-R1+-лимфоциты, %	7,4 (6,4 - 7,6)	9,2 (8,2- 12,9)	9,3 (4,5- 12,5)	12,1 (7,1- 15,6)
		<b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	p <sub>1</sub> =0,46 p <sub>2</sub> =0,42	<b>p<sub>1</sub>=0,04</b> p <sub>2</sub> =0,59 p <sub>3</sub> =0,15
TNF-R1+-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,14 (0,12 - 0,15)	0,16 (0,14-0,20)	0,16 (0,09-0,25)	0,22 (0,14-0,32)
		<b>p<sub>1</sub>=0,03</b>	p <sub>1</sub> =0,63 p <sub>2</sub> =0,59	<b>p<sub>1</sub>=0,04</b> p <sub>2</sub> =0,32 p <sub>3</sub> =0,20
Продукция sTNF-R1, нг/мл	2,67 (1,47 - 4,16)	1,33 (1,31-1,40)	1,27 (1,24-1,29)	1,35 (1,33-1,38)
		<b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b>	<b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> <b>p<sub>2</sub>&lt;0,01</b>	<b>p<sub>1</sub>&lt;0,01</b> p <sub>2</sub> =0,75 <b>p<sub>3</sub>&lt;0,01</b>

**Примечание:** p<sub>1</sub> - уровень статистической значимости отличия значений показателей по сравнению с таковыми у здоровых доноров, p<sub>2</sub> - у больных LADA, p<sub>3</sub> - у пациентов с СД1 (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферонни); Me - медиана, n - объем выборки.

Сравнение содержания TNF- $\alpha$  в культуральной среде и количества лимфоцитов, презентующих рецептор к TNF- $\alpha$  между группами СД1 и LADA без осложнений отличий не выявило (p>0,05), а концентрация sTNF-R1 была выше (p=0,025) у пациентов с LADA (табл. 26).

При наличии нефро-/ретинопатии у больных LADA содержание TNF $\alpha$  в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов в 7,5 раз превысило значение в контрольной группе ( $p=0,015$ ) и в 5,5 раз – в группе сравнения ( $p=0,014$ ) (содержание TNF- $\alpha$  в культуральных средах пациентов с СД2, имеющих микрососудистые осложнения, было сопоставимо со значениями в группе здоровых доноров ( $p>0,05$ )). Количество лимфоцитов, несущих молекулу CD120<sup>+</sup>, в рассматриваемой подгруппе пациентов с LADA повышалось в 3 раза по сравнению с контрольной группой ( $p=0,008$ ), а содержание sTNF-R1 снижалось ( $p=0,001$ ). Значения изучаемых показателей рецепции TNF- $\alpha$  у больных LADA и СД2 (имеющих микрососудистые осложнения) не различались ( $p>0,05$ ) (табл. 26).

Увеличилась концентрация TNF- $\alpha$  в культуральных средах ( $p=0,016$ ) и количество CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $p=0,03$ ) в группе пациентов с LADA, отягощенном нефро-/ретинопатией, по сравнению к показателям в группе LADA, осложнений не имеющей, а концентрация sTNF-R1 в данных группах не различалась ( $p>0,05$ ) (табл. 26).

Сравнение показателей системы TNF- $\alpha$  между группами LADA и СД1, имеющих микрососудистые осложнения, показало наличие более высоких значений всех изучаемых параметров у пациентов с LADA ( $p=0,007$  – для TNF- $\alpha$ ;  $p=0,013$  – для CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов;  $p=0,035$  – для sTNF-R1) (табл. 26).

Известно, что важным регулятором цитокиновой активности является sTNF-R1, представляющий собой внеклеточный домен мембран-ассоциированного TNF-рецептора [Mac Ewan D.J., 2002]. В норме содержание растворимого рецептора к TNF- $\alpha$  до 100 раз превосходит уровень самого TNF- $\alpha$ . Установлена его способность препятствовать взаимодействию TNF- $\alpha$  с мембранными рецепторами, преимущественно с TNF-R1 (но не TNF-R2), что ограничивает цитотоксическое влияние цитокина на клетки [Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P., 2003].

Биологическая роль sTNF-R1 состоит в его способности выступать антагонистом (или ингибитором) TNF- $\alpha$ , напрямую блокируя действие цитокина или конкурируя за связывание с мембранными рецепторами [Кричевская О.А., Клюквина Н.Г., Александрова Е.Н. и др., 2005]. Основываясь на полученных в ходе настоящего исследования данных, можно предположить, что угнетение продукции растворимой формы рецептора к TNF- $\alpha$  приводит к тому, что концентрация воздействующего на клетки-мишени (к числу которых относятся лимфоциты) TNF- $\alpha$  возрастает, несмотря на то, что продукция самого цитокина не увеличивается. Известно, что формирование комплексов TNF- $\alpha$ –sTNF-R1 при сниженной концентрации последних в циркуляции может приводить к усилению активности и пролонгированию действия цитокина [Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J., 2001].

Рассматривая в нашей работе состояние системы TNF- $\alpha$  у пациентов с LADA, не имеющих микрососудистых осложнений, выявили изменения, аналогичные СД1, то есть наблюдалось снижение концентрации sTNF-R1 (табл. 26). Однако, значение концентрации данного компонента системы TNF- $\alpha$  у больных LADA превышало показатель при СД1, что можно рассматривать как более благоприятный фактор для выживания  $\beta$ -клеток. Эти данные отражают различия в механизмах развития аутоиммунного диабета первого типа и латентного аутоиммунного диабета взрослых, и, по-видимому, указывают на вклад дисбаланса в системе TNF- $\alpha$  в скорость развития аутоиммунного поражения островковых клеток. В свою очередь представляется вероятным, что нарушения в системе TNF- $\alpha$  при аутоиммунных вариантах СД является первичными, генетически детерминированными, и в меньшей степени связанными с дисгликемией и дислипидемией, поскольку оказываются максимально выраженными при СД1, а не в группе пациентов с СД2, при котором метаболические

нарушения выражены сильнее [Занозина, О.В., 2010; Pharm M.N., Hawa M.I., Pfleger C.et al., 2011].

Считается, что TNF- $\alpha$ , мембранная и растворимая формы TNF- $\alpha$ -рецептора составляют единую биологическую систему, функциональная активность которой зависит от концентрации и скорости клиренса ее компонентов [Chan F.K., 2000]. По-видимому, возросшее по сравнению со здоровыми донорами количество TNF-R1<sup>+</sup>-клеток у пациентов с диабетом, показанное в проведенном нами исследовании с применением проточной лазерной цитометрии, является результатом дисбаланса между продукцией TNF- $\alpha$  и синтезом sTNF-R1. Исследования показывают, что высвобождение TNF-R1 с клеточных мембран за счет ферментативного расщепления индуцирует непосредственно TNF- $\alpha$  [MacEwan D.J. , 2002].

Суммируя результаты иммуноферментного анализа концентрации IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , sTNF-R1 и иммунофенотипирования клеток крови, выявившие количество CD25<sup>+</sup>-, CD124<sup>+</sup>-, CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов, необходимо отметить следующее. Среди изучаемых вариантов сахарного диабета наибольшая концентрации цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  в культуральных средах и максимальный процент лимфоцитов крови, несущих к ним рецепторы, определялись при LADA с микрососудистыми осложнениями. Помимо этого, как для LADA, так и для СД1 (в большей, по сравнению с LADA, степени) оказалось характерным снижение концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови растворимой формы рецептора к TNF- $\alpha$ , который является важным компонентом в механизме регуляции провоспалительной активности TNF- $\alpha$ .



Таблица 26

Концентрация TNF- $\alpha$ , растворимого рецептора 1 типа к TNF- $\alpha$  в супернатантах культуры моноклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы 1 типа к TNF- $\alpha$  у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом с учетом наличия микрососудистых осложнений (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		TNF- $\alpha$ , пг/мл	CD120 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	sTNF-R1, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	7,30 (6,30-7,60)	2670,00 (1470,00 - 4160,00)
СД1 (n=37)	Без осложнений (n=18)	35,73 (22,15-48,98) $p_1 > 0,05$	10,60 (7,00-12,50) $p_1 > 0,05$	1281,40 (1250,10-1291,80) <b><math>p_1 = 0,001</math></b>
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	20,62 (19,98-75,63) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	7,75 (3,40-12,10) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	1260,60 (1239,70-1312,70) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_2 > 0,05$
LADA(n=31)	Без осложнений (n=12)	23,72 (19,80-370,49) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	8,85 (8,20-14,15) <b><math>p_1 = 0,035</math></b> $p_2 > 0,05$	1354,30 (1312,70-1396,00) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> <b><math>p_2 = 0,025</math></b>
	Наличие микрососудистых осложнений (n=19)	354,34 (250,12-375,33) <b><math>p_1 = 0,015</math></b> <b><math>p_3 = 0,016</math></b> <b><math>p_4 = 0,007</math></b>	19,80 (13,55-23,45) <b><math>p_1 = 0,008</math></b> <b><math>p_3 = 0,03</math></b> <b><math>p_4 = 0,013</math></b>	1333,50 (1323,10-1385,60) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_3 > 0,05$ <b><math>p_4 = 0,035</math></b>

Продолжение таблицы 26				
СД2 (n=67)	Без осложнений (n=18)	28,56 (21,89-129,87) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	11,40 (7,25-14,20) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	1354,30 (1323,10-1375,20) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> <b><math>p_2 = 0,004</math></b> $p_3 > 0,05$
	Наличие микрососудистых осложнений (n=49)	62,86 (22,30-231,07) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ <b><math>p_5 = 0,014</math></b> $p_6 > 0,05$	12,10 (6,10-15,05) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$	1364,70 (1333,50-1416,80) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> <b><math>p_4 = 0,036</math></b> $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$

**Примечание:**  $p_1$  – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров;  $p_2$  – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 без осложнений;  $p_3$  – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA без осложнений;  $p_4$  – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД1 с микрососудистыми осложнениями;  $p_5$  – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с LADA с микрососудистыми осложнениями;  $p_6$  – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с СД2 без осложнений; n – количество обследованных лиц

### **3.6.4. Особенности системы «Fas –FasL–sFasL» у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом**

Последние данные свидетельствуют, что дисрегуляция рецептор-опосредованного апоптоза играет ключевую роль в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний. В то время как дефекты апоптоза могут быть ответственны за неэффективную элиминацию аутореактивных лимфоцитов путем AICD в ходе терминации иммунного ответа, избыточная клеточная гибель вносит свой вклад в дисфункцию ткани-мишени [Потапнев, М.П., 2002]. По существующим представлениям, в патогенез аутоиммунных заболеваний вовлечены как генетические дефекты путей реализации сигнала рецепторов смерти, так и их цитокин-опосредованная дисрегуляция [Fas S. C., Fritzsching B., Suri-Payer E., Krammer P. H., 2006].

Активированные Т-клетки экспрессируют как CD95, так и CD95L. При завершении иммунного ответа они подвергаются CD95-опосредованному апоптозу [Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003]. Согласно данным ряда авторов, Th1-клетки преимущественно экспрессируют CD95L, и их AICD происходит по пути CD95, в то время как Th2-лимфоциты относительно устойчивы к опосредованной рецепторами смерти AICD и экспрессируют лишь мизерные количества CD95L. Однако они в больших количествах экспрессируют TRAIL и *in vitro* способны вызывать опосредованную им гибель Th1-клеток [Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003]. Делеция аутореактивных Т-клеток является CD95-опосредуемой и не нарушается при гиперэкспрессии Bcl-2. Таким образом, AICD отводят важную роль в поддержании иммунологической толерантности на периферии [Roberts A. I., Devadas S., Zhang X., 2003].

Предшествующими исследованиями в экспериментальных моделях аутоиммунного сахарного диабета показано, что основным механизмом гибели островковых клеток является воздействие аутореактивных Т-

лимфоцитов. Также было доказано, что активированные Т-лимфоциты вызывают гибель  $\beta$ -клеток 2 различными путями: один из них – перфорин-гранзим В-опосредованный путь и второй – Fas-опосредованный апоптоз. Перфорин-гранзимовый путь клеточной гибели был доказан как в естественных, так и в индуцированных моделях развития сахарного диабета. Напротив, результаты изучения Fas-опосредованного пути гибели инсулинпродуцирующей паренхимы оказались в некоторой степени противоречивыми. С одной стороны сообщалось, что аутореактивные лимфоциты от NOD мышей не способны вызвать диабет у мышей реципиентов с нокаутом гена Fas (Fas-deficient NOD-*lpr/lpr* mice). Этот факт привел к утверждению важной роли Fas-опосредованного апоптоза гибели  $\beta$ -клеток в индукции аутоиммунного сахарного диабета. С другой стороны мыши с данной мутацией не являются подходящими для адекватной оценки событий по следующим соображениям – лимфоциты этих мышей конститутивно экспрессировали огромное количество FasL на своей мембране, что позволяло им выживать даже после воздействия летальных доз радиации. После этого, для уточнения роли Fas-зависимого апоптоза в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета была предложена другая модель с введением блокирующих FasL антител, что не вызывало других параллельных иммунологических феноменов как у мышей с нокаутом гена Fas. Введение антител к FasL (K10) не влияло на частоту развития сахарного диабета у NOD мышей после введения им аутореактивных Т-лимфоцитов. Данная модель показала отсутствие значимой роли FasL-рецептора на поверхности аутореактивных Т-лимфоцитов в индукции апоптоза островковых клеток. Чтобы подтвердить, что отсутствие Fas на поверхности островковых клеток не препятствует их аутоиммунному повреждению, был проведен эксперимент с подсаживанием Fas-негативных островков NOD мышкам. Островки полностью погибли через 4 недели и в них находили выраженную лимфоидную инфильтрацию, что опять же

подтвердило факт, что экспрессия Fas на поверхности в-клеток не является строго необходимой для индукции ее аутоиммунного повреждения.

С другой стороны, сохранялся парадокс – почему диабет не может быть перенесен мышам с нокаутом гена Fas (Fas-deficient NOD-lpr/lpr mice), несмотря на то, что Fas не играет критической роли в индукции аутоиммунного инсулита? Как уже было замечено, у мышей с данной мутацией развивается параллельно другой иммунологический феномен – экспрессия огромного количества FasL на поверхности лимфоцитов. Снижение количества FasL-экспрессирующих лимфоцитов, вызванное тимусэктомией у новорожденных мышей, все-таки способствовало развитию аутоиммунного инсулита. И, кроме того, введение FasL-несущих лимфоцитов от мышей с нокаутом гена Fas, полностью аннулировало развитие диабета у мышей, которым вводились аутореактивные Т-лимфоциты от NOD мышей. Это окончательно позволило заключить следующее – FasL-экспрессирующие лимфоциты способны предотвратить развитие (перенос) заболевания и FasL не является основной эффекторной молекулой в-клеточной гибели. Эти эксперименты привели к осознанию, что FasL может быть рассмотрен с позиции терапевтической мишени для снижения риска индукции аутоиммунного инсулита, так как может вызывать Fas-опосредованный апоптоз аутореактивных Т-лимфоцитов. Непосредственно клетки, несущие FasL использоваться для этого не могут, так как их введение вызывает фульминантный гепатит у мышей. Другой подход с использованием метода обработки растворимым человеческим (!) sFasL диабетогенных Т-лимфоцитов *ex vivo* оказался более эффективным и показал значительно ослабление переноса аутоиммунного сахарного диабета в эксперименте на мышах [Myung-ShikLee, 2002; Kim, S., Kim, K.-A., Hwang, D.-Y., 2000].

Согласно полученным данным, содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas(CD95+), в крови больных LADA составило

14,7±5,6% и было статистически значимо выше, чем в группах пациентов с СД1 и СД2 (табл. 27). Данный факт свидетельствует о большей их готовности к Fas-опосредованному апоптозу, и, возможно, более эффективную AICD аутореактивных Т-лимфоцитов при LADA.

В отличие от Fas, экспрессия Fas-L ограничена активированными Т-лимфоцитами [Todaro M., Zeuner A., Stassi G., 2004]. К настоящему времени утвердилось мнение, что помимо функции апоптоз-индуцирующего лиганда, Fas-L выполняет и рецепторные функции. Известно, что для того, чтобы Т-киллеры полностью реализовали свой пролиферативный и цитотоксический потенциал необходим обратный сигнал от Fas-L. Напротив, в отношении CD4+-лимфоцитов обратный сигнал от Fas-L является ингибирующим и приводит к остановке клеточного цикла, предупреждающей клональную экспансию. Таким образом, «стимуляция» Fas-L является потенциально противовоспалительной и специфичной в отношении CD4+-лимфоцитов [Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В., 2009].

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas-L (CD95L+), в крови больных LADA составляло 86,7±6,8%, что было достоверно выше, чем при СД1 и СД2. В то же время, при LADA абсолютное содержание этих клеток было меньше, чем при СД1 (табл. 27). В общей выборке пациентов с СД увеличение количества лимфоцитов, несущих Fas-L прямо коррелировало с повышением концентрации ICA ( $r=0,82$ ,  $p<0,05$ ), в свою очередь отметим, что максимальная концентрация данного вида аутоантител регистрировалась у пациентов с LADA (табл.18). Положительная корреляционная связь данного показателя с уровнем ICA, вероятно, отражает взаимосвязь активности аутоиммунного процесса с активацией рецепторопосредованного механизма апоптоза аутореактивных лимфоцитов у пациентов с LADA, что естественно может ограничивать первичную аутоиммунную реакцию и быть одним из механизмов лимитирования

активности аутоиммунного инсулита, пролонгированию его во времени с сохранением длительно эндогенной секреции инсулина при данном варианте СД.

Растворимая форма Fas-L (sFas-L) образуется путем альтернативного сплайсинга или протеолитического расщепления мембранной формы Fas-L (шеддинга) металлопротеиназами 3 и 7 [Владимирская Е.Б., 2002; Фильченков, А.А., 2002]. Шеддинг чаще всего является следствием активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток.

Таблица 27

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

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

**Примечание:\*** – отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при  $p < 0,05$ ; p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя больных LADA, p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя пациентов с СД1 (критерий Манна – Уитни).

Продemonстрировано, что шеддинг является высокоспецифическим и строго регулируемым событием, основанным на избирательной активации протеиназ. Экспрессия мембранных и растворимых форм антигенов имеет различные механизмы регуляции, а повышение уровня экспрессии мембранного антигена не обязательно влечет за собой увеличение уровня растворимой формы антигена во внеклеточном пространстве, и наоборот [Владимирская Е.Б., 2002; Фильченков А.А., 2002].

Хотя Fas связывается как с мембранной, так и с растворимой формой Fas-L, лишь первая вызывает его активацию [Владимирская Е.Б., 2002; Фильченков А.А., 2002]. С одной стороны, sFas-L конкурирует с мембранной за рецепторное связывание и, таким образом, выступает ее антагонистом [Владимирская Е.Б., 2002; Фильченко, А.А., 2002], с другой стороны, sFas-L может выступать агонистом Fas при связывании с компонентами внеклеточного матрикса [Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В., 2009]. Более того, sFas-L является хемоаттрактантом и привлекает нейтрофилы и макрофаги [Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В., 2009]. Растворимая форма Fas-L связывается с Fas рецептором и запускает апоптотический сигнал в несущих на своей поверхности Fas клетках. Таким образом, изменение активности системы Fas/Fas-L играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний [Потапнев М.П., 2002; Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003].

Продукция мононуклеарными лейкоцитами растворимой формы Fas-L (sFas-L) также была максимальной при LADA (табл. 27), что не только отражает общее повышение экспрессии мембранной формы Fas-L, но и может косвенно указывать на ингибирование Fas-опосредованного апоптоза  $\beta$ -клеток при LADA. В отличие от мышинных моделей, где sFasL не оказывает влияние на элиминацию аутореактивных клонов лимфоцитов, так как не обладает апоптотической активностью, в организме человека sFasL



способствует элиминации Т-лимфоцитов «памяти» (CD45RB<sup>low</sup>) из циркуляции, что естественно может влиять на темпы развития и выраженность аутоиммунного инсулита [Todaro M., Zeuner A., Stassi G., 2004].

### **Заключение**

Таким образом, вышеописанные изменения в экспрессии Fas/FasL мононуклеарными лейкоцитами крови и продукции sFasL указывают на значимый вклад данной системы в иммунопатогенез аутоиммунного сахарного диабета. Особенностью LADA является повышение экспрессии мембранных Fas/FasL, вследствие чего можно регистрировать максимальную степень активации Т-клеток у пациентов с LADA в сравнении с другими вариантами СД. Взаимосвязь системы Fas/FasL с параметрами продукции аутоантител к клеткам островков Лангерганса может указывать на продолжающуюся аутоиммунную агрессию против данной ткани, в отличие от СД 1 типа классического течения (с фульминантно протекающим инсулитом, быстрой гибелью  $\beta$ -клеток и уменьшением активности аутоиммунного воспаления в островках Лангерганса вследствие потери антигена) и СД 2 (отсутствие аутоиммунного процесса в патогенезе заболевания).

Вследствие устойчивости Th2-лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу, можно предположить, что в иммунопатогенезе LADA значимую роль может выполнять процесс повышенной элиминации Th1-клеток из циркуляции вследствие активации апоптоза с участием Fas/FasL при LADA. Требуются дополнительные исследования по изучению роли Fas/FasL – опосредованного апоптоза аутореактивных лимфоцитов для оценки возможности использования данного механизма в разработке стратегии первичной профилактики СД1 и возможности ограничения выраженности аутоиммунного инсулита при уже развившемся заболевании с целью поддержания длительно эндогенной секреции инсулина.

## **Глава 4. КЛИНИЧЕСКИЕ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННЫХ ТИРЕОПАТИЙ**

### **4.1. Клинические и метаболические особенности аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и болезни Грейвса (БГ)**

В настоящее время аутоиммунные тиреопатии остаются одной из наиболее актуальных проблем современной эндокринологии, что во многом объясняется не только достаточно высоким уровнем заболеваемости, но и многочисленностью органов и систем, реагирующих на воздействие тиреоидных гормонов, вовлекаемых в патологический процесс при нарушении их продукции. Тиреоидная дисфункция приводит к возникновению осложнений со стороны различных органов и систем, существенно ухудшающих качество жизни пациентов [Кандрор В.И., 2006; 2008]. Кроме того, актуальность проблемы аутоиммунных заболеваний щитовидной железы обусловлена недостаточной ясностью патогенеза, недостаточно разработанными методами диагностики, включая иммунологические, а также подходами терапевтического воздействия.

Болезнь Грейвса (БГ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ) являются наиболее распространенными аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, основное звено патогенеза которых – дисбаланс факторов клеточного и гуморального иммунитета. Детальные механизмы этих заболеваний до сих пор окончательно не выяснены.

Известно, что данные заболевания щитовидной железы имеют схожую этиологию. Патогенез аутоиммунного тиреоидита и болезни Грейвса развивается во многом по схожим иммунологическим механизмам, но характеризуется специфичностью уровня продукции цитокинов. Считается, что аутоиммунный тиреоидит протекает преимущественно по Th1 типу иммунного ответа и характеризуется преобладанием продукции цитокинов

Th1 профиля, которые приводят к активации преимущественно клеточного иммунитета. Тогда как для болезни Грейвса свойственно усиление роли Th2-лимфоцитов в развитии патологического процесса, что приводит к усилению продукции антител. При обоих заболеваниях отмечается лимфоидная инфильтрация органа и наличие в сыворотке крови антитиреоидных антител. По мнению ряда авторов, данные заболевания развиваются в результате дефекта в системе иммунологического выживания, при этом выживают и пролиферируют Т-лимфоциты, обладающие способностью реагировать с органоспецифическими антигенами. Участие цитокинов в аутоиммунных реакциях несомненно, так как презентация антигена антиген-презентирующими клетками (АПК), функционирование Т- и В-лимфоцитов обязательно сопровождается продукцией различных цитокинов, определенным образом влияющих на клетки-мишени.

Считается, что цитокины играют принципиальную роль в индукции и поддержании иммунологической толерантности, и продуцируются не только лимфоцитами, инфильтрирующими щитовидную железу, но также клетками эндотелия и клетками фолликулярного эпителия [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002]. Кроме иммуномодулирующего эффекта, цитокины способны регулировать пролиферацию, процессы апоптоза фолликулярного эпителия, а также изменять функциональную активность тиреоцитов, оказывать прямое воздействие на гормональную активность тиреоидных клеток, стимулировать лимфоидную инфильтрацию щитовидной железы [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002], а значит влиять на клиническое течение заболеваний. В частности, поддержание воспаления в ткани ЩЖ либо его разрешение зависит от баланса про- и противовоспалительных цитокинов и их рецепторов, в частности, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 [Tang H., Meroni P.L., 1993; Fang Y., Sharp G.C., Braley-Mullen H., 2008].

Но, несмотря на общие звенья патогенеза, функциональные нарушения в щитовидной железе при АИТ и БГ различны. В последние годы активно ведутся исследования молекулярных механизмов дисрегуляции иммунной системы при данных заболеваниях. На современном этапе изучения данной проблемы становится очевидным, что модель, указывающая на поляризацию иммунного ответа по Th1 пути при АИТ и по Th2 пути при БГ, требует существенного дополнения и расширения.

Таким образом, пониманию патогенеза и причин различного клинического течения отдельных вариантов аутоиммунной патологии щитовидной железы могут способствовать исследования, направленные на изучение состояния системы цитокинов. Кроме того, изучение цитокинов и их рецепторов, а также клинических особенностей, обусловленных их воздействием, может внести вклад в формирование объективных и надёжных прогностических иммунологических критериев исхода и течения исследуемых заболеваний.

Вышеизложенное определило актуальность исследования параметров клеточного иммунитета и системы регуляторных (Th1/Th2-профиль) цитокинов у пациентов с АИТ и БГ, а также определение наиболее важных с точки зрения разработки диагностических, прогностических и терапевтических алгоритмов, иммунологических маркеров этих органоспецифических аутоиммунных заболеваний.

Для определения специфических особенностей иммунопатогенеза АИТП (БГ, АИТ) и прогнозирования их функциональных исходов было проведено обсервационное когортное исследование, дизайн которого и принципы стратификации клинических групп рассмотрены во 2-й главе (см. рис.4).

В зависимости от полученных при гормональном обследовании данных, все пациенты с АИТ были распределены на две группы. В первую

группу были включены 19 пациентов с верифицированным диагнозом АИТ в состоянии эутиреоза. Показатели гормонального статуса больных находились в пределах референсной нормы (табл. 28). Средний возраст больных в группе составил  $40,4 \pm 2,7$  года, а продолжительность заболевания АИТ (с момента выявления) –  $4,3 \pm 1,3$  года. Пациенты для поддержания эутиреоза получали препараты синтетического гормона щитовидной железы (L-тироксин в дозах от 50 до 100 мкг). У всех пациентов в анамнезе имелось указание на первичный гипотиреоз, чаще (у 75%) в клинической манифестации заболевания, что являлось одним из диагностических критериев АИТ и послужило основанием для назначения заместительной гормональной терапии. На момент обследования все пациенты находились в состоянии компенсированного эутиреоза не менее 6 месяцев (учитывались данные предыдущих обследований). Сводная характеристика показателей в обследованных группах пациентов представлена в табл. 28.

Вторую группу составили 10 пациентов с верифицированным диагнозом АИТ в состоянии гипотиреоза. Средний возраст больных данной группы соответствовал 51,0 (50,0-54,0) годам, средняя продолжительность заболевания АИТ (с момента выявления) – 2,5(0,5-7,5) года. У 3 (30%) пациентов данной группы АИТ был выявлен впервые, гипотиреоз был зафиксирован в дебюте заболевания. У остальных пациентов длительность предшествующего исследованию гипотиреоза оценивалась вероятно и могла составлять от 6 до 18 месяцев (так как при предыдущем гормональном обследовании гипотиреоз у данных пациентов не обнаруживался и диагноз АИТ не выставлялся). У всех пациентов с АИТ проведены визуальная и ультразвуковая оценка объема щитовидной железы.

Таблица 28

Общая клинико-лабораторная характеристика обследованных групп пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и болезнью Грейвса (БГ)(Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель	Здоровые доноры	АИТ, гипотиреоз	АИТ, эутиреоз	БГ, эутиреоз	БГ, тиротоксикоз
Количество пациентов, n	30	10	19	14	31
Средний возраст пациентов, лет	47,3 (37,2-51,0)	50,0 (31,0-53,0)		47,0 (35,0-53,0)	
Продолжительность заболевания (с момента выявления), лет	-	7,5 (1,9 – 13,1)		2,6 (1,0 – 4,3)	
Курение, %	-	23,0		29,4	
Узловые образования, %	-	42,9 (12)		27,8 (12)	
Объем щитовидной железы (на момент обследования), мл	13,7 (7,4-17,9)	14,1 (3,6-24,5)	17,6 (13,8-25,4)	15,2 (11,1-19,3)	32,6 (17,5-50,1)

Продолжение таблицы 28					
Уровень ТТГ, мМЕд/л	1,5 (0,8-2,7)	32,7 (26,2-39,1)	2,6 (2,3-2,8)	0,29 (0,02-0,56)	0,05 (0,01-0,19)
Концентрация св.Т4, пмоль/л	18,7 (12,1-21,1)	5,5 (2,5-8,7)	17,0 (15,9-18,3)	15,7 (15,3-16,2)	56,8 (28,4-71,2)
Концентрация св.Т3, пмоль/л	3,4 (2,3-4,2)	1,8 (1,6-2,0)	2,5 (2,0-3,3)	3,8 (2,9-4,8)	6,5 (2,3-13,0)
Концентрация АТ–ТПО, МЕд/л	менее 30	636,0 (366,0-782,0)		611,0 (201,0-824,2)	
Концентрация АТ–ТГ, МЕд/л	менее 30	193,6 (65,8-249,0)		312,4 (212,1-398,9)	
Концентрация АТ-рТТГ, Ед/л	не определяемая	0,5 (0,0-0,8)		33,2 (7,5-34,7)	

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

Ультрасонографическая картина у пациентов с АИТ характеризовалась диффузным снижением эхогенности ткани щитовидной железы, чередованием участков повышенной и пониженной эхогенности без четких контуров, диффузным снижением кровотока в ткани железы. Сравнительно чаще в сравнении с группой БГ (28%) выявлялись узловые образования – в 43% случаев ( $\chi^2=1,58, p>0,05$ ).



Рис 27. Ультрасонографическая картина АИТ с формированием псевдоузлов (участки повышенной и/или пониженной эхогенности с более четкими контурами (метка) на фоне общего снижения эхогенности).

С учетом ультразвуковых данных у 2(7%) пациентов с АИТ была диагностирована атрофическая форма АИТ (средний объем щитовидной железы составил 5,35(3,6-7,1) мл при нижней границе нормы 8 мл), у 18 (60,7%) больных была выявлена фиброзная или фиброзно–узловая форма АИТ, которая характеризовалась нормальным объемом щитовидной железы, варьировавшим в пределах 8–18 мл (в среднем данный показатель составил 13,4(9,6-14,8) мл. У 9(32,1%) пациентов была выявлена гипертрофическая форма АИТ (т.н. гипертрофический тиреоидит Хасимото), показатели объема щитовидной железы при ультразвуковом обследовании составляли более 18-25 мл, в среднем 27,9(25,7-29,4) мл.

В процессе верификации диагноза при узловом зобе 12 пациентам была проведена тонкоигольная пункционная биопсия щитовидной железы. При этом обнаруживались характерные цитологические признаки АИТ, такие как наличие в пунктате значительного количества лимфоидных



клеток различной степени зрелости, скопления клеток Гюртле, нормальные тиреоциты, клеточный детрит и фиброзные структуры при малом количестве коллоида. Следует отметить, что в стандарты диагностики АИТ пункционная биопсия не включена, и она проводилась исключительно по показаниям тем больным, которым требовалась дифференциальная диагностика узловых образований в щитовидной железе. Во всех представленных случаях диагноз АИТ был морфологически подтвержден.

В группу пациентов с болезнью Грейвса (БГ) были включены 45 пациентов (14 мужчин и 31 женщина) в возрасте 18–55 лет (47,0(35,0-53,0)) лет, удовлетворяющие следующим критериям: верифицированный диагноз БГ, проживание в Томском регионе 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 т.ч. пальпаторная характеристика щитовидной железы, установление степени тяжести тиреотоксикоза), анализ медицинской документации, оценка ультразвукографических данных щитовидной железы, оценка гормонального статуса (уровень ТТГ, свободных фракций тироксина и трийодтиронина, АТ–ТПО и АТ–ТГ, АТ-рТТГ).

При оценке анамнестических данных наличие наследственной предрасположенности было выявлено у 27(60%) больных. Явных внешних провоцирующих факторов при детальном выяснении анамнеза не обнаруживалось (в протокол опроса входило выяснение предшествующих заболеваний и принимаемых препаратов, в т.ч. профилактической вакцинации в течение предшествующего года, экологической обстановки места проживания, учитывались особенности питания, условия труда и наличие профессиональных вредностей), однако все пациенты отмечали

наличие стрессорных влияний (напряженная рабочая обстановка, личные и семейные обстоятельства).

19 пациентам по различным показаниям (отсутствие ремиссии болезни Грейвса на фоне тиреостатической терапии в течение 1,5 лет, диффузно-узловой токсический зоб, многоузловой зоб на фоне АИТ) проведено оперативное лечение в объеме субтотальной и тотальной тиреоидэктомии. В последующем ткань щитовидной железы была подвергнута гистологическому и иммуногистохимическому исследованию (исследование экспрессии рецепторов IL-2, IL-4, TNF-RI).

При анализе клинической картины было установлено, что предъявляемые жалобы полностью соответствуют синдрому тиреотоксикоза: у 32 (70%) пациентов отмечалось снижение веса от 3 до 12 кг, неврологическая симптоматика (раздражительность, плаксивость, тремор) имела место у 38 (85%) больных, все пациенты в той или иной степени отмечали слабость, снижение работоспособности и чувство жара, потливость. Практически все пациенты отмечали наличие тахикардии, а в 9 (20%) случаях – и аритмии (подтвержденной электрокардиографией). Кроме того, в единичных случаях отмечались такие симптомы, как нарушение менструального цикла (у 9 (30%) пациенток); учащенный жидкий стул (у 4 (10%) пациентов); признаки относительной надпочечниковой недостаточности (артериальная гипотензия, пигментация кожных покровов, снижение мышечного тонуса) - у 2 (4%) пациентов.

Пальпаторно щитовидная железа у всех пациентов характеризовалась диффузным увеличением: I степени (по критериям ВОЗ) у 38,9% пациентов и II степени - у 61,1%, тугоэластичной консистенцией, отсутствием болезненности при пальпации, подвижностью при глотании. При клиническом осмотре кроме неврологических симптомов также выявлялись признаки эндокринной офтальмопатии (т.н. глазные симптомы) различной степени выраженности у 10 (13, 5%) пациентов). У пациентов с БГ

эндокринная офтальмопатия встречалась чаще (26,3%), чем у пациентов с АИТ – в 3,3% ( $p < 0,05$ ).

В целом полученные показатели гормонального статуса соответствовали общепринятым критериям диагностики БГ (таб. 28).

Ультрасонографически щитовидная железа у обследованных пациентов характеризовалась увеличением объема, в подавляющем большинстве случаев за счет обеих долей. Так, при показателе верхней границы нормы для женщин 18 мл, для мужчин – 25 мл, у обследованных больных объем щитовидной железы составил от 8,6 до 81,0 мл, среднее значение данного показателя –  $28,8 \pm 19,4$  мл. Кроме того, эхоскопически выявлялись диффузное снижение эхогенности ткани, неомогенная, крупнозернистая структура щитовидной железы, диффузное усиление васкуляризации ткани железы при проведении цветного доплеровского картирования.

Согласно клиническим критериям (классификация В.Г. Баранова, 1977 г.), степень тяжести тиреотоксикоза у 36 (80%) пациентов характеризовалась как средняя, 7 (15%) пациентам была диагностирована легкая степень тиреотоксикоза и 2 (5%) пациентам – тяжелая. Пациенты с БГ были обследованы на фоне тиреотоксикоза в начале заболевания до назначения тиреостатической терапии с целью исключения возможного влияния антитиреоидных препаратов на исследуемые показатели, часть пациентов обследована на фоне стабильного (не менее 6 мес) эутиреоидного состояния, достигнутого на фоне тиреостатической терапии (мерказолил, тирозол).

Показатели липидограммы различались между группами АИТ и БГ достоверно по показателю концентрации общего холестерина, при АИТ показатель составил 5,6(5,1-6,0) ммоль/л, а при БГ – 4,5(4,1-5,9) ммоль/л ( $p = 0,02$ ), показатели ТАГ, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП статистически значимо между группами без учета функционального статуса ЩЖ не различались.

При оценке липидограммы в подгруппах пациентов с учетом тиреоидного статуса были получены достоверные различия по показателю холестеринемии между эутиреодными и гипертиреодными пациентами с БГ (таб. 29). В целом, наименьшие концентрации всех липидных фракций регистрировались в подгруппе гипертиреодных пациентов, что отражает ускорение основного обмена с увеличением степени тяжести тиреотоксикоза. В основе данного эффекта лежат разобщение окислительного фосфорилирования и стимуляция энергозатрат вследствие активации  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{АТФазы}$ , непосредственное влияние на митохондриальные транспортеры адениннуклеотидов.

Таблица 29

Показатели липидного обмена у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями в зависимости от функционального состояния щитовидной железы (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

Показатель	АИТ, гипотиреоз	АИТ, эутиреоз	БГ, эутиреоз	БГ, гипертиреоз
общий холестерин, ммоль/л	5,4 (5,1-6,2)	5,8 (5,2-6,0) $p_1 > 0,05$	4,8 (3,8-5,9) $p_2 > 0,05$	4,4 (4,1-4,6) <b><math>p_3 = 0,04</math></b>
ХС-ЛПНП, ммоль/л	3,1 (2,9-4,0)	3,3 (2,9-3,4) $p_1 > 0,05$	2,5 (1,6-3,5) $p_2 > 0,05$	2,3 (1,8-2,5) $p_3 > 0,05$
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,4 (1,1-1,8)	1,3 (1,0-1,5) $p_1 > 0,05$	1,5 (1,3-1,6) $p_2 > 0,05$	1,2 (1,1-1,3) $p_3 > 0,05$
Триглицериды, ммоль/л	1,7 (1,3-2,2)	1,7 (1,1-3,4) $p_1 > 0,05$	1,3 (1,1-1,4) $p_2 > 0,05$	1,1 (1,0-1,7) $p_3 > 0,05$

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

#### **4.2. Особенности продукции и спектр аутоантител к фолликулярному эпителию щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса**

Основными среди патогенетически и клинически значимых ауто-АГ ЩЖ являются тиреоглобулин (ТГ) и тиреоидная пероксидаза (ТПО), которые относятся к крупномолекулярным олигомерным гликопротеинам. ТГ, циркулируя в кровотоке, функционирует как матрица для синтеза тиреоидных гормонов и как белок-носитель, обеспечивающий хранение активных форм этих гормонов. После синтеза в тиреоцитах ТГ подвергается йодированию, суммарный уровень которого может определять иммуногенные свойства молекулы. Йод имеет весомое значение не только в формировании иммуногенности ТГ в целом, но и в придании тонкой специфичности и, возможно, функциональности АГ детерминантам в составе молекулы этого белка [Bulow Pedersen I, Laurberg P, Knudsen N, Jurgensen T et al., 2005]. Иными словами, расширение спектра эпитопов молекуле ТГ делает этот белок значимым для индукции и прогрессирования аутоиммунных заболеваний ЩЖ [Okosieme O.E., Parkes A.B., Premawardhana L.D. et al., 2003]. ТПО, являясь в отличие от ТГ мембран-связанным белком, также играет ключевую роль в биосинтезе тиреоидных гормонов. Этот фермент способен осуществлять модификацию антигенных свойств ТГ [Okosieme O.E., 2005, McLachlan S.M., Rapoport B., 2014]. ТПО – активный “участник” процессов комплемент-зависимой и АТ-опосредованной цитотоксичности. При этом анти-ТГ, обладая по природе цитотоксическим потенциалом, в отличие от анти-ТПО участия в комплемент-зависимом АТ-опосредованном цитолизе ткани ЩЖ, как правило, не принимают [Исаева М.А., Богатырева З.И., Сучкова Е.Н. и др, 2007]. Важно подчеркнуть, что в кровотоке ТГ обнаруживается в значительно больших концентрациях по сравнению с ТПО, при этом

иммуногенный потенциал ТГ также значительно более выражен, чем у ТПО.

Еще один важный белковый компонент ЩЖ – рецептор к ТТГ, являющийся членом семейства G-белок-сопряженных рецепторов [Farid NR., Szkudlinski MW., 2004; Wang HC, Klein JR., 2001].

Механизм, с помощью которого ауто-АГ ЩЖ реализуют свои ауто-АГ и иммуногенные свойства, до конца неясен. Сегодня можно выделить несколько таких возможных механизмов, имеющих значение для понимания ранних стадий развития АТ и БГ, а именно [Carayanniotis G, Kong YC., 2000]:– аберрантная экспрессия молекул HLA класса II;– посттрансляционная модификация ауто-АГЩЖ с образованием так называемых неоэпитопов, например, в результате йодирования ТГ;– спонтанное образование супер-АГ с последующей поликлональной активацией иммуноцитов;– молекулярная мимикрия, когда пептиды микробного происхождения имеют структурное сходство с ауто-АГ ЩЖ, а специфические клоны иммуноцитов реагируют и на чужеродный, и на собственный ауто-АГ в сопоставимых масштабах.

В настоящее время в литературе накоплен значительный фактический материал, в котором представлено непосредственное участие иммунной системы в патогенезе АИТ и БГ. Так, в частности, молекулярная мимикрия и генетическая предрасположенность уже описаны как основные механизмы, лежащие в основе вышеуказанных заболеваний. Более того, в реализации предрасположенности подтверждена особая роль генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-комплекса) [Кандрор и др., 2004; Yamamoto K, Itoh M, Okamura T, Kimura M, 2012]. Первыми после АГ стимуляции у больных с АИТ и БГ начинают функционировать сразу две группы клеток: клетки с цитотоксическим в отношении ЩЖ эффектом (аутореактивные цитотоксические Т-лимфоциты/ЦТЛ) и В-лимфоциты, которые, перемещаясь в ЩЖ, начинают продуцировать широкий спектр

антитиреоидных ауто-АТ, в том числе с цитотоксическим эффектом в отношении ЩЖ. Длительный процесс аутоагрессии ведет к снижению функции ЩЖ – прогрессирующему гипотиреозу. Причем ведущим патогенетическим механизмом, ответственным за развитие АИТ и БГ в целом, является цитотоксический эффект ЦТЛ [Watanabe M., Yamamoto N., Maruoka H., 2002; Weetman A.P., 2004].

В то же время ауто-АТ среди патогенетических механизмов развития АИТ и БГ отводится не последняя роль: такого рода АТ, направленные, в основном, против конформационно-зависимых, нативных детерминант ауто-АГ ЩЖ, определяют, в противовес клеточным механизмам аутоагрессии, не начало заболевания, а скорее его прогрессирование. Тем более что титр антитиреоидных ауто-АТ при АИТ и БГ зависит от активности аутоиммунного процесса и может испытывать колебания по мере увеличения длительности заболевания и итогов проводимого лечения.

Среди широкой палитры антитиреоидных ауто-АТ следует выделить анти-ТГ, анти-ТПО, анти-ТГ-ТПО и ауто-АТ к рецептору ТТГ. При этом долевое участие каждого из вышеуказанных семейств ауто-АТ в суммарном цитотоксическом, в том числе комплемент-зависимом, эффекте на ЩЖ до сих пор остается не ясным [Wan Q., McCormick D.J., David C.S., Kong Y.C., 1998; Андреева А.В., Сучкова Е.Н., Гаджиева С.И. и др., 2011].

Анти-ТГ ауто-АТ представлены у больных АИТ и БГ гетерогенной группой белков, относящихся, в основном, к IgG-изотипу [Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.V. et al., 2006]. Анти-ТГ ауто-АТ выявляются у 70–80% пациентов с АИТ и у 30–49% – с БГ. При этом титры определяемых в крови больных анти-ТГ ауто-АТ не коррелируют, как правило, с состоянием функции ЩЖ. Однако часть из популяции анти-ТГ ауто-АТ обладают функциональностью (каталитической активностью в отношении ТГ). Такие функционально активные анти-ТГ ауто-АТ обнаруживаются исключительно при АИТ и БГ, тогда как антитиреоидные АТ, лишенные

каталитической активности, найдены и у лиц, не имеющих заболеваний ЩЖ [Bulow Pedersen I., Laurberg P., Knudsen N. et al., 2005].

В отличие от анти-ТГ анти-ТПО ауто-АТ обладают выраженной способностью индуцировать цитотоксичность и вызывать деструктивные процессы в ткани ЩЖ. Постоянно выявляется прямая корреляция между титром этих АТ и гистологическими изменениями в ЩЖ, которые имеются и при АИТ, и при БГ [Outschoorn IM, Talor MV, Burek CL, Hoffman WN., 2014]. В нашем исследовании подтверждена функциональная взаимосвязь между титром АТ-ТПО и цитотоксическим потенциалом клеточного иммунитета, так, среди всех пациентов с АИТП обнаруживалась умеренной силы прямая корреляционная связь титра АТ-ТПО и абсолютным количеством  $CD8^{+}$ -лимфоцитов ( $r=0,41$ ;  $p=0,03$ ), а также абсолютным количеством  $CD4^{+}$ -лимфоцитов ( $r=0,38$ ;  $p=0,04$ ). Подобных ассоциаций не выявлено между параметрами клеточного иммунитета при АИТП и титром АТ-рТТГ, АТ-ТГ.

У пациентов с АИТ концентрации антител к ТПО в крови в фазе гипотиреоза и эутиреоза значимо не различались ( $p>0,05$ ). При БГ уровень данных антител у лиц в фазе эутиреоза был достоверно ниже ( $p=0,02$ ), чем у пациентов с тиреотоксикозом. В свою очередь, концентрация анти-ТПО у больных АИТ в фазе эутиреоза достоверно превышала ( $p=0,04$ ) аналогичный показатель у пациентов с БГ с таким же функциональным состоянием щитовидной железы (табл. 30).

Наряду с образованием вышеназванных ауто-АТ у больных АИТ и БГ отмечена индукция образования ауто-АТ к рецептору ТТГ. При этом образуются как тиреостимулирующие антитела (у 2–5% больных АИТ и БГ присутствие таких АТ сочетается с синдромом тиреотоксикоза), выявляемые в значительно меньшем титре и у незначительного количества больных по сравнению с больными, страдающими БГ, так и ТТГ-блокирующие АТ [Orgiazzi J. , 2013]. При этом у больных с АИТ часто



встречается тандем, состоящий из стимулирующих и блокирующих ТТГ антител, этиология которого пока неизвестна [Trifnescu R, Poianг C, Hortopan D., 2008]. Ауто-АТ к рецептору ТТГ способны имитировать функцию гормона и вызывать аутоиммунный процесс в результате связывания с рецептором ТТГ и последующей стимуляции (на имитационной основе) тиреоидных клеток ЩЖ [Bartalena L., 2013]. АТ-р-ТТГ, стимулирующие функцию железы, усиливают продукцию тиреоидных гормонов, тогда как блокирующие АТ-рТТГ предотвращают активацию рецептора ТТГ и могут иметь значение в патогенезе атрофии железы и развитии гипотиреоза у некоторых больных с АИТ [Morita T., Tamaі H., Oshima A. et al., 1990].

Оценивая содержание в крови АТ-рТТГ у пациентов с АИТ, установили наличие незначительных концентраций данного анализата, не превышающих диагностически значимый порог и не изменяющихся в зависимости от гормонального статуса щитовидной железы ( $p > 0,05$ ). При БГ концентрация анти-рТТГ при гипертиреозе была значительно выше ( $p = 0,006$ ), чем при эутиреоидном состоянии щитовидной железы. Сравнение данного показателя между группами пациентов с изучаемыми тиреопатиями в фазе эутиреоза закономерно показало повышенные концентрации антител к рТТГ при БГ ( $p = 0,007$ ) (табл. 30).

Подытоживая полученные результаты можно заключить, что гуморальное звено иммунитета активно вовлечено в развитие рассматриваемых эндокринопатий. Среди аутоиммунных вариантов сахарного диабета антителопродукция была более выражена при LADA. Относительно аутоиммунных тиреопатий установлено, что при АИТ высокое содержание в крови антител сохраняется 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.

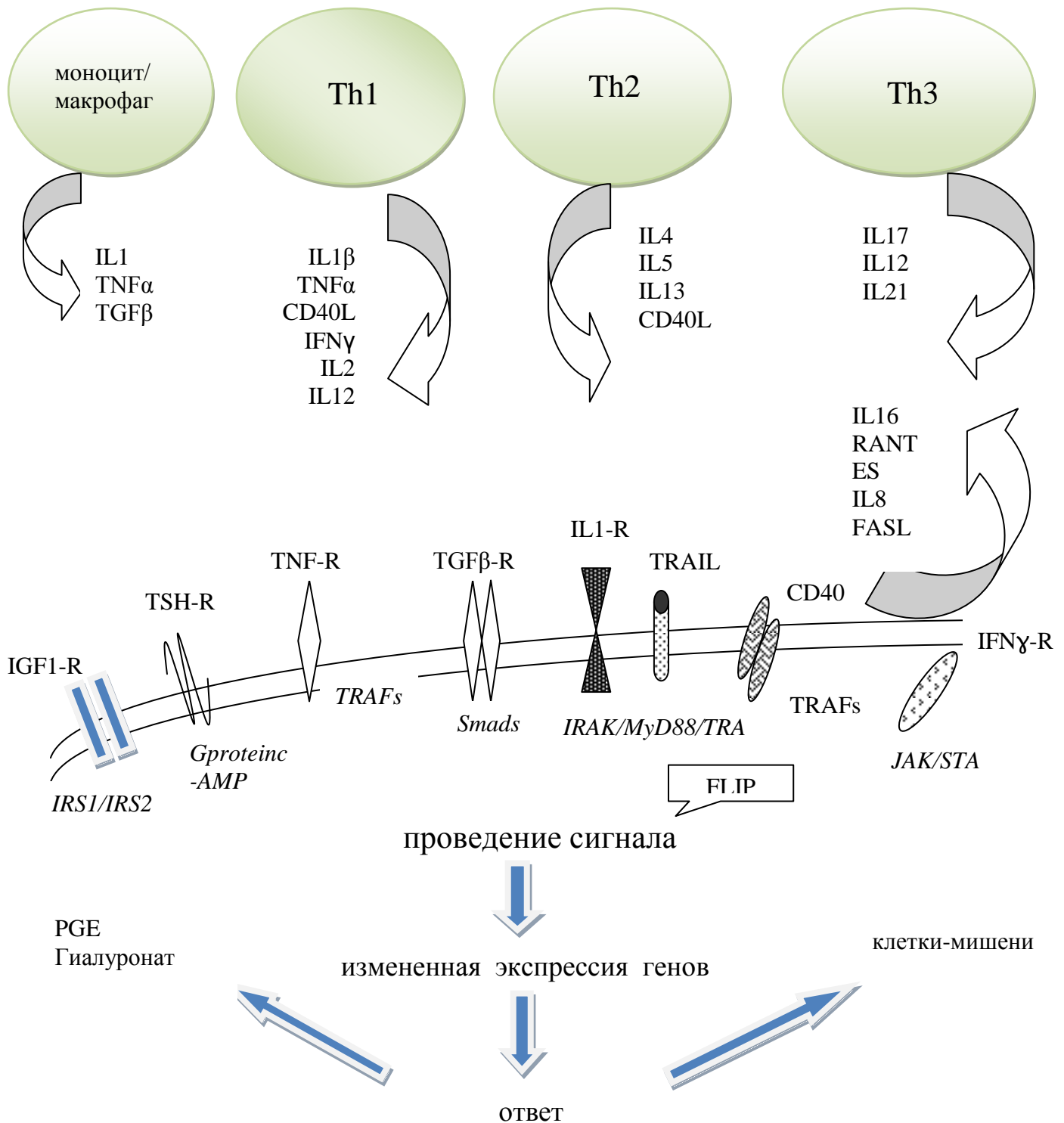
Еще одним косвенным доказательством различных функциональных ресурсов ауто-АТ являются полученные корреляционные взаимосвязи между титром АТ-ТПО и АТ-рТТГ и объемом щитовидной железы при АИТП: так получены прямые корреляционные взаимосвязи между титром АТ-рТТГ (стимулирующие пролиферативные процессы) и отрицательные – между АТ-ТПО и объемом ЩЖ (опосредуют АТ-зависимую клеточную цитотоксичность).

Таблица 30

Концентрация антител к структурам фолликулярного эпителия щитовидной железы в сыворотке крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

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

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



**Рис.28.** Цитокиноопосредованные взаимодействия при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы с участием Т-хелперных лимфоцитов (Th1, Th2, Th3)

Резидентные клетки иммунной системы рекрутируют циркулирующие «профессиональные» иммунокомпетентные клетки (ИКК), секретируя цитокины-хемокины. «Профессиональные» ИКК, инфильтрируя ткань щитовидной железы, обеспечивают увеличение концентрации различных цитокинов. Профиль цитокинов зависит от субпопуляции Th-лимфоцита (Th1, Th2, Th3). Действие цитокинов опосредовано связыванием их со своими специфическими рецепторами. Аутоантитела также способны связываться и активировать клеточные рецепторы (рецептор к ТТГ, инсулиноподобному фактору роста – ИФР-I). Уровень продукции простагландина E<sub>2</sub>, гиалуроновой кислоты зависит от концентрации провоспалительных цитокинов.

#### **4.3. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями**

В настоящее время существуют 3 основные гипотезы развития аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, и в частности болезни Грейвса: 1-я – молекулярная мимикрия, 2-я – эффект свидетеля и 3-я – дефект специфических лимфоцитов-супрессоров. Какая из этих гипотез верна, должны показать дальнейшие исследования.

Механизмы сохранения толерантности к собственным тканям разделяют на центральные и периферические. При формировании иммунной системы плода в тимусе и в костном мозге путем апоптоза погибают более 97% развивающихся лимфоцитов, рецепторы которых распознают собственные антигены, представляемые эпителиальными и дендритными клетками этих органов. К таким антигенам, как уже говорилось, относится и рецептор ТТГ. Этот процесс, называемый клональной делецией, или негативной селекцией, лежит в основе формирования центральной толерантности иммунной системы к собственным антигенам. Важно подчеркнуть, что негативная селекция эффективна не на 100%, и поэтому некоторые лимфоциты, способные распознавать собственные антигены, хотя и взаимодействующие с ними с низким сродством (аутореактивные) все же попадают в кровь. Однако ужас “аутоксичности” настолько велик, что на периферии существуют дополнительные барьеры безопасности, или механизмы формирования толерантности лимфоцитов к собственным антигенам. К таким механизмам относятся: 1) клональная делеция; 2) индукция анергии; 3) игнорирование; 4) иммунное отклонение; 5) активная супрессия. Последний механизм, то есть активная супрессия лимфоцитов, считается основным механизмом их периферической толерантности. Среди клеток иммунной системы различают так называемые регуляторные Т-лимфоциты, маркерами которых являются молекулы CD4+ и CD25+ на их мембране. Эти

лимфоциты, распознавая антигены, стимулируют Т-лимфоциты-супрессоры, а они, в свою очередь, подавляют активность эффекторных лимфоцитов.

В настоящее время нет данных, которые указывали бы на нарушение механизмов центральной толерантности при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Таким образом, если исходить из признания первичности дефекта именно в иммунной системе при этих заболеваниях, то важнейшую роль должен играть срыв периферической толерантности лимфоцитов к аутоантигенам, а среди механизмов такого срыва – нарушение супрессии аутореактивных лимфоцитов. В этом отношении весьма привлекательной представляется гипотеза Вольпе, который допускает возможность существования не только общих, но и специфических супрессоров, то есть тех, которые подавляют аутоиммунные реакции не на все, а только на конкретные антигены. Иначе трудно было бы понять существование органоспецифических и даже антиген-специфических (как в случае болезни Грейвса) аутоиммунных заболеваний [Кандрор В.И. , 2008].

Морфологическое изучение ткани ЩЖ как при АИТ, так и при БГ выявляет обширную инфильтрацию органа лимфоцитами, плазматическими клетками и макрофагами [Stassi G., 2002; Swain M. et al., 2005; Кандрор В.И., 2008; Poncin S. et al., 2008]. Выявленное в нашем исследовании снижение общего количества циркулирующих лимфоцитов крови (табл. 29) во всех изучаемых группах пациентов по сравнению со здоровыми лицами отчасти может быть связано с механизмами перераспределения иммуноцитов и миграцией данной популяции клеток в ткань щитовидной железы с формированием лимфоидного инфильтрата. Однако по результатам нашей работы изменения субпопуляционного состава лимфоцитов при АИТ и БГ были выражены в разной степени (табл. 31).

Аутоиммунный тиреоидит в фазе эутиреоза характеризовался повышением содержания в крови относительного количества Т-лимфоцитов, а также абсолютного числа Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов относительно группы здоровых доноров (табл. 31). Данные исследований последних лет показывают, что от содержания CD8+-лимфоцитов и их функциональной активности зависит течение воспалительного процесса при аутоиммунных тиреопатиях [Дрометр Д.А. и соавт., 2007; Fang Y. et al., 2008]. CD8+-клеточную цитотоксичность можно рассматривать в качестве одной из ведущих причин гибели тиреоцитов при АИТ, что связано с их цитокинпродуцирующей активностью [Weetman A.P., 2004; Дрометр Д.А. и соавт., 2007] и способностью индуцировать апоптоз фолликулярных клеток ЩЖ [Stassi G., Mada R., 2002; Stojanovic J., 2009].

Роль Th-лимфоцитов в патогенезе тиреопатий, по данным литературы, заключается в продукции иммунорегуляторных цитокинов, влияющих на выраженность клеточных и гуморальных иммунных реакций [Nielsen C.H. et al., 2007; Poncin S. et al., 2008]. Нами установлено, что в крови пациентов с АИТ превышено по сравнению со здоровыми лицами количество лимфоцитов, презентирующих рецептор к IL-4 (табл. 33), что можно рассматривать, как активацию Th2-пути иммунного ответа. Известно, что Th2-клоны лимфоцитов участвуют в контроле производства аутоантител плазматическими клетками. В нашей работе у больных АИТ в состоянии эутиреоза закономерно наблюдается высокий уровень антител к ТПО (табл. 30), для которых установлена способность индуцировать деструктивные процессы в фолликулярном эпителии ЩЖ [Исаева М.А. и соавт., 2007; Андреева А.В. и соавт., 2011], способствуя развитию гипотиреоза. Кроме того, в экспериментальных работах C.H. Nielsen et al. (2007) показано, что мононуклеарные лейкоциты крови продуцируют повышенное количество цитокинов (в частности TNF- $\alpha$  и IL-4) при

культивировании в присутствии сыворотки крови, содержащей высокие титры антител к структурам ЩЖ. Это указывает на определенную роль аутоантител в стимуляции иммуноцитов к продукции цитокинов, которые в последствии способствуют CD4<sup>+</sup>-клеточной пролиферации при аутоиммунном тиреоидите.

У пациентов с БГ в состоянии эутиреоза нами обнаружено повышение в крови процента Т-лимфоцитов, сочетающееся с увеличением количества лимфоцитов, несущих рецептор к IL-4, относительно здоровых доноров (табл. 31, 33). Очевидно, что CD124<sup>+</sup>-лимфоциты при БГ, как и при АИТ, участвуют в Т-зависимой В-клеточной активации, ведущей к продукции аутоантител. Как показывают результаты наших исследований, при БГ в фазе эутиреоза в крови определяются повышенный уровень антител к ТПО и рецептору ТТГ (табл. 30). Это указывает на то, что при данном заболевании в ЩЖ сочетаются процессы активации гормон-продуцирующей функции фолликулярных клеток за счет стимулирующего действия аутоантител к рТТГ [Исаева М.А. и соавт., 2007; Anvari M. et al., 2010] и гибели тиреоцитов, вызванной анти-ТПО-зависимой цитотоксичностью [Кандрор В.И., 2006; Исаева М.А. и соавт., 2007; Андреева А.В. и соавт., 2011]. Другой особенностью БГ, выявленной в нашей работе, оказалось снижение по сравнению с контрольной группой, а также группой больных АИТ количества лимфоцитов, презентирующих рецептор к IL-2 (табл. 32). Опираясь на данные литературы, указывающие на увеличение при БГ концентрации растворимого рецептора к IL-2 как в сыворотке крови, так и в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов [Komorowski J., 2001; Jiskra J. et al., 2009], можно предположить, что в данном случае имеет место повышенный шеддинг рецепторов к IL-2 с мембраны лимфоцитов. Однако точные механизмы этого процесса не раскрыты. Поскольку взаимодействие IL-2 с комплементарными ему рецепторами на поверхности лимфоцитов является



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

Помимо этого, при сравнении субпопуляционного состава лимфоцитов крови и уровня аутоантител к ТПО между пациентами с АИТ и БГ в состоянии эутиреоза нами было выявлено повышение числа CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> и значительно увеличенное содержание в крови антител к ТПО у больных аутоиммунным тиреоидитом (табл. 30, 31). Это дополнительно подчеркивает преобладание цитотоксических компонентов аутоиммунного воспалительного ответа, направленного против ткани ЩЖ при АИТ.

В тоже время, как при АИТ, так и при БГ мы выявили абсолютный дефицит в крови циркулирующих NK-лимфоцитов (табл. 31). Снижение численности в крови популяции циркулирующих NK-клеток, а также угнетение их функциональной активности при аутоиммунных тиреопатиях отмечено и другими исследователями [Wenzel B. et al., 1998; Solerte S.B. 2005; Liu R. et al., 2006]. Предполагается, что данный феномен способствует потере иммунологического контроля над аутореактивными клонами лимфоцитов и их выживанию [Fort M.M. et al., 1998; Liu R. et al., 2006], что во многом определяет активность формирования аутоиммунного процесса при АИТ и БГ.

Таблица 31

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

Показатель		Здоровые доноры (n=30)	АИТ (n=29)		БГ (n=45)	
			Гипотиреоз (n=10)	Эутиреоз (n=19)	Эутиреоз (n=14)	Гипертиреоз (n=31)
Общее количество лимфоцитов	%	35,00 (22,00-48,00)	31,00 (24,00-33,00) $p_1 > 0,05$	28,50 (25,50-36,00) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	35,00 (34,00-38,00) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	34,00 (30,00-38,5) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
	$10^9/\text{л}$	2,63 (2,43-2,84)	2,19 (1,67-2,67) <b><math>p_1 = 0,01</math></b>	2,02 (1,71-2,81) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_2 > 0,05$	1,64 (1,36-1,87) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_3 > 0,05$	1,98 (1,61-2,19) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_4 > 0,05$
CD3+-лимфоциты	%	69,70 (65,94-70,90)	71,04 (70,33 – 71,74) $p_1 > 0,05$	75,22 (74,32-76,06) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> <b><math>p_2 = 0,001</math></b>	75,00 (72,34-75,45) <b><math>p_1 = 0,01</math></b> $p_3 > 0,05$	74,06 (69,30-79,18) <b><math>p_1 = 0,024</math></b> $p_4 > 0,05$
	$10^9/\text{л}$	1,32 (1,24-1,36)	1,38 (1,07-1,69) $p_1 > 0,05$	1,87 (1,31-2,75) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	1,18 (1,07-1,24) <b><math>p_1 = 0,01</math></b> <b><math>p_3 = 0,05</math></b>	1,45 (1,06-1,51) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$

Продолжение таблицы 31						
CD8+-лимфоциты	%	24,28 (23,93-29,48)	23,96 (23,38 – 24,53) $p_1 > 0,05$	25,59 (22,97-27,70) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	28,45 (21,69-29,12) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	26,05 (24,10-28,82) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
	$10^9/\text{л}$	0,32 (0,30-0,37)	0,46 (0,33-0,61) <b><math>p_1 = 0,01</math></b>	0,59 (0,48-0,89) <b><math>p_1 = 0,006</math></b> $p_2 > 0,05$	0,39 (0,38-0,43) $p_1 > 0,05$ <b><math>p_3 = 0,04</math></b>	0,43 (0,39-0,56) <b><math>p_1 = 0,01</math></b> $p_4 > 0,05$
CD4+-лимфоциты	%	44,30 (34,16-45,81)	43,65 (41,28 – 46,03) $p_1 > 0,05$	45,73 (44,46-50,94) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	41,16 (39,69-41,88) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	44,07 (40,51-51,96) $p_1 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
	$10^9/\text{л}$	0,46 (0,44-0,57)	0,85 (0,56-1,20) <b><math>p_1 = 0,006</math></b>	1,10 (0,79-1,85) <b><math>p_1 = 0,008</math></b> $p_2 > 0,05$	0,68 (0,59-0,79) $p_1 > 0,05$ <b><math>p_3 = 0,045</math></b>	0,85 (0,65-1,10) <b><math>p_1 = 0,004</math></b> $p_4 > 0,05$
CD16+CD56 <sup>low</sup> - лимфоциты	%	17,24 (16,18-19,88)	18,69 (15,54 – 21,84) $p_1 > 0,05$	9,25 (7,31-12,65) <b><math>p_1 = 0,002</math></b> <b><math>p_2 = 0,002</math></b>	12,43 (12,10-17,37) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	10,48 (5,80-12,41) <b><math>p_1 = 0,001</math></b> $p_4 > 0,05$

	Продолжение таблицы 31					
	$10^9/\text{л}$	0,84 (0,66-0,87)	0,33 (0,24-0,43) <b>p<sub>1</sub>=0,000</b>	0,24 (0,15-0,30) <b>p<sub>1</sub>=0,000</b> p <sub>2</sub> >0,05	0,21 (0,16-0,25) <b>p<sub>1</sub>=0,006</b> p <sub>3</sub> >0,05	0,19 (0,16-0,26) <b>p<sub>1</sub>=0,000</b> p <sub>4</sub> >0,05
CD19+-лимфоциты	%	10,78 (8,09–14,18)	9,35 (6,45 – 12,25) <b>p<sub>1</sub>=0,03</b>	14,03 (11,56-15,36) p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>=0,006</b>	11,51 (10,66-13,98) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05	11,73 (9,05-17,65) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>4</sub> >0,05
	$10^9/\text{л}$	0,20 (0,15-0,27)	0,18 (0,12-0,22) p <sub>1</sub> >0,05	0,32 (0,20-0,52) p <sub>1</sub> >0,05 <b>p<sub>2</sub>=0,05</b>	0,19 (0,17-0,20) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05	0,25 (0,15-0,39) p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>4</sub> >0,05

**Примечание:** p<sub>1</sub> – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров; p<sub>2</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p<sub>3</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p<sub>4</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с БГ в фазе эутиреоза; n – количество обследованных лиц

Таким образом, результаты иммунофенотипирования циркулирующих в крови лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями указывают на существенные изменения в субпопуляционном составе клеток. Поскольку лимфоциты являются непосредственными участниками воспалительных реакций, протекающих в органе-мишени, преобладание содержания одних типов клеток и дефицит других на фоне нестабильного гормонального статуса пациентов частично отражает механизмы развития сахарного диабета и тиреопатий аутоиммунного генеза.

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

При АИТ у пациентов в фазе гипотиреоза ряд показателей субпопуляционного состава лимфоцитов крови и цитокинового статуса соответствовал иммунологической картине эутиреоидного состояния. В частности, определялось повышение в крови количества цитотоксических лимфоцитов, Th-клеток, снижение содержания NK-лимфоцитов (табл. 31) и угнетение системы TNF- $\alpha$  в исследованиях *in vitro* (табл. 33, 34) по сравнению со здоровыми донорами. Отличало гипотиреоидное состояние снижение количества Т- и В-лимфоцитов, более выраженное уменьшение содержания циркулирующих NK-клеток (табл. 31) и снижение концентрации IL-2 (табл. 32) относительно показателей у пациентов с АИТ

в состоянии эутиреоза. В тоже время концентрация аутоантител к ТПО не изменялась в зависимости от функционального состояния ЩЖ (табл. 30).

По данным литературы известно, что в физиологических концентрациях тиреоидные гормоны стимулируют иммунные реакции. Рецепторы к тиреоидным гормонам обнаружены в ядрах и митохондриях гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов [Dorshkind K., Horseman N.D., 2000; Botella-Carretero J. et al., 2005; Ланин Д.В. и соавт. 2011]. В экспериментальных работах на мышах, лишенных генов, кодирующих тиреоидные рецепторы, обнаружено снижение числа Т- и В-лимфоцитов в селезенке [Arpin C. et al., 2000]. Полученные нами результаты исследований подтверждают то, что гипотиреоидное состояние угнетает развитие В-лимфоцитов, а также способствует снижению количества Т-лимфоцитов и клеток натуральных киллеров, в частности за счет уменьшения продукции IL-2. В тоже время, повышенные концентрации аутоантител указывают на то, что при АИТ уровень антигенной активности и напряженность иммунного ответа поддерживается на высоком уровне, не зависимо от гормонального статуса.

По результатам различных клинических и экспериментальных исследований установлено, что повышенные концентрации  $T_3$  и  $T_4$  способны оказывать стимулирующие действие на антителогенез и реакции гуморального иммунного ответа, а также влиять на содержание Th1-клеток и цитотоксических лимфоцитов в крови [Красных М.С. и соавт., 2004; Botella-Carretero J. et al., 2005; Hodkinson C.F. et al., 2009; Ланин Д.В. и соавт. 2011].

Наше исследование показало, что гипертиреоидное состояние у пациентов с БГ отличалось от состояния эутиреоза более высокой продукцией мононуклеарными лейкоцитами IL-2 (табл. 32), а также значительно повышенной концентрацией антител к ТПО и рТТГ (табл. 30). При этом, как и в фазе эутиреоза, гипертиреоз протекал на фоне

увеличенного относительного содержания Т-клеток, повышенного абсолютного количества цитотоксических и Th-лимфоцитов, а также дефицита NK-клеток по сравнению со здоровыми донорами (табл. 31).

Существуют данные о том, что повышенное содержание в крови свободного  $T_3$  ассоциировано со снижением апоптоза лимфоцитов и поддержанию численности данной популяции клеток [Hodkinson C.F. et. al., 2009]. При БГ данное обстоятельство может способствовать выживанию аутореактивных клонов лимфоцитов и поддержанию аутоиммунного воспаления в ткани ЩЖ. Наряду с этим, повышенная функциональная активность ЩЖ при БГ потенцирует иммунные реакции гуморального звена иммунитета, что подтверждается индукцией антителогенеза, а также выявленном в нашем исследовании увеличении количества лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4 (табл. 33) относительно здоровых лиц.

Как уже было отмечено, тироксин способен стимулировать реакции клеточной составляющей иммунного ответа. Существуют данные, о том, что действие гормона направлено на наивные Т-клетки (Th0) и стимуляцию Th1-лимфоцитов [Красных М.С. и соавт., 2004]. Следствием этого процесса может являться обнаруженная в ходе нашей работы повышенная продукция мононуклеарными лейкоцитами IL-2 (табл. 32). Следует отметить, что, как и в состоянии эутиреоза, при тиреотоксикозе у пациентов с БГ нами зафиксировано снижение количества лимфоцитов, несущих рецептор к IL-2 (табл. 32) по сравнению со здоровыми донорами, а данные литературы указывают на повышение растворимой фракции рецептора IL-2 в состоянии гипертиреоза [Botella-Carretero J. et al., 2005]. Вероятно, это в некоторой степени ограничивает клеточно-опосредованные иммунные процессы, направленные против аутоантигенов фолликулярного эпителия ЩЖ.

#### **4.4. Состояние системы «лиганд-рецептор» IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями**

##### **4.4.1. Оценка продукции в культуре моноклеарных лейкоцитов крови и рецепции лимфоцитами IL-2 у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями**

Анализ результатов показал, что содержание IL-2 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов крови при АИТ в фазе эутиреоза было сопоставимо с концентрацией IL-2 у здоровых доноров ( $p>0,05$ ). При гипотиреозе продукция цитокина снижалась относительно значений показателя в контрольной группе ( $p=0,046$ ) и группе пациентов с АИТ в эутиреоидном состоянии ( $p=0,04$ ). Количество лимфоцитов, презентующих молекулу CD25 у пациентов с АИТ значимо не отличались от аналогичного показателя у здоровых лиц ( $p>0,05$ ), и не изменялись в зависимости от функционального состояния (гипо- и эутиреоз) щитовидной железы (табл. 32).

При БГ в фазе гипертиреоза концентрация IL-2 достоверно превышала значение в группах здоровых доноров ( $p=0,02$ ) и пациентов с БГ в состоянии эутиреоза ( $p=0,035$ ). Продукция цитокина в эутиреоидной фазе БГ не отличалась от продукции IL-2 у здоровых лиц ( $p>0,05$ ) и была сопоставима ( $p>0,05$ ) со значением рассматриваемого параметра у больных АИТ в фазе эутиреоза ( $p>0,05$ ) (табл. 12). Количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов при БГ в подгруппах пациентов с тиреотоксикозом и в эутиреоидном состоянии было сопоставимо ( $p>0,05$ ). В тоже время относительно здоровых доноров в обеих подгруппах пациентов с БГ количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов было снижено ( $p=0,04$  и  $p=0,036$  при гипертиреозе и эутиреозе, соответственно) (табл. 32).

Сравнение содержания в крови лимфоцитов, несущих рецепторы к IL-2 у пациентов в фазе эутиреоза при АИТ и БГ показало снижение количества CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов только при БГ ( $p=0,045$ ) (табл. 32).



Таблица 32

Концентрация IL-2 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-2 у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

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

**Примечание** (здесь и в табл. 33 и 34): p<sub>1</sub> – достоверность отличий показателя относительно аналогичного показателя в группе здоровых доноров; p<sub>2</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе гипотиреоза; p<sub>3</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с АИТ в фазе эутиреоза; p<sub>4</sub> – относительно аналогичного показателя в группе пациентов с БГ в фазе эутиреоза; n – количество обследованных лиц

#### 4.4.2. Оценка продукции в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови и рецепции лимфоцитами IL-4 у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями

Оценка содержания IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови не выявила достоверных отличий показателя как в зависимости от нозологического варианта тиреопатий, так в зависимости от функционального состояния щитовидной железы (p>0,05 во всех случаях) (табл. 33).

Таблица 33

Концентрация IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы к IL-4 у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

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

При определении количества в крови CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов установлено, что содержание данных клеток по сравнению со здоровыми донорами увеличено ( $p=0,001$ ) при АИТ в фазе эутиреоза, в то время как при гипотиреозе определяется лишь тенденция ( $p=0,05$ ) к повышению их количества. У пациентов с БГ, не зависимо от гормонального статуса, количество лимфоцитов, презентующих рецептор к IL-4, превышало значение показателя в контрольной группе ( $p=0,005$  и  $p=0,008$  при гипертиреозе и эутиреозе, соответственно) (табл. 33). Количество CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с АИТ и БГ в фазе эутиреоза достоверно не различались ( $p > 0,05$ ) (табл. 33).

#### **4.4.3. Состояние системы «лиганд-рецептор» TNF- $\alpha$ у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями**

Исследование системы фактора некроза опухолей альфа у больных аутоиммунными тиреопатиями позволило установить, что концентрация TNF- $\alpha$  и растворимого TNF-рецептора в культуральных средах, а также количество CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови у пациентов с АИТ в состоянии эутиреоза снижались по сравнению со значениями у здоровых доноров ( $p=0,013$ ,  $p=0,001$  и  $p=0,000$ , соответственно) (табл. 34).

При гипотиреозе продукция TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами была сопоставима с показателем в контрольной группе ( $p>0,05$ ), в то время как процент лимфоцитов, презентирующих мембранный рецептор к TNF- $\alpha$  достоверно снижался ( $p<0,001$ ). Концентрация sTNF-R1 у пациентов с АИТ в гипотиреоидном состоянии снижалась относительно здоровых лиц ( $p=0,02$ ), но превышала показатель в группе пациентов в фазе эутиреоза ( $p=0,043$ ) (табл. 34).

Продукция TNF- $\alpha$  у пациентов с БГ по сравнению со здоровыми донорами была снижена как в фазу эутиреоза, так при гипертиреозе ( $p=0,000$  в обоих случаях). Также уменьшалось количество CD120<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $p=0,002$  при эутиреозе и  $p=0,003$  при гипертиреозе) и содержание в супернатантах клеточных культур sTNF-R1 ( $p=0,001$  независимо от гормонального статуса). При БГ значения изучаемых элементов системы TNF- $\alpha$  достоверно не различались в зависимости от функционального состояния щитовидной железы ( $p>0,05$  во всех случаях), а также не заявлено отличий по показателям продукции и рецепции TNF- $\alpha$  между группами пациентов с АИТ и БГ в эутиреоидном состоянии ( $p>0,05$  во всех случаях) (табл. 34).

Для полноты описания состояния системы фактора некроза опухолей при аутоиммунных тиреопатиях и уточнения причины снижения содержания TNF- $\alpha$  в культуре лейкоцитов крови мы сочли целесообразным

определить ФГА-стимулированную продукцию данного цитокина (табл. 35).

Таблица 34

Концентрация TNF- $\alpha$ , растворимого рецептора 1 типа к TNF- $\alpha$  в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов крови, презентующих рецепторы 1 типа к TNF- $\alpha$  у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		TNF- $\alpha$ , пг/мл	CD120 <sup>+</sup> - лимфоциты, %	sTNF-R1, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	7,30 (6,30-7,60)	2670,00 (1470,00 - 4160,00)
АИТ (n=29)	Гипотиреоз (n=10)	19,12 (15,91-212,72) <b>p<sub>1</sub>&gt;0,05</b>	1,00 (0,60-2,70) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,001</b>	1446,80 (845,50- 1790,40) <b>p<sub>1</sub>=0,02</b>
	Эутиреоз (n=19)	18,05 (12,73-106,43) <b>p<sub>1</sub>=0,013</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	3,00 (1,00-4,50) <b>p<sub>1</sub>=0,004</b> <b>p<sub>2</sub>&gt;0,05</b>	845,50 (587,80- 1275,00) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> <b>p<sub>2</sub>=0,043</b>
БГ (n=45)	Эутиреоз (n=14)	13,05 (10,90-16,04) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,001</b> <b>p<sub>3</sub>&gt;0,05</b>	2,75 (0,95-6,15) <b>p<sub>1</sub>=0,002</b> <b>p<sub>3</sub>&gt;0,05</b>	1027,67 (587,80- 1532,70) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> <b>p<sub>3</sub>&gt;0,05</b>
	Гипертиреоз (n=31)	16,51 (12,21-28,44) <b>p<sub>1</sub>&lt;0,001</b> <b>p<sub>4</sub>&gt;0,05</b>	1,30 (0,70-4,10) <b>p<sub>1</sub>=0,003</b> <b>p<sub>4</sub>&gt;0,05</b>	1446,80 (637,70- 2219,90) <b>p<sub>1</sub>=0,001</b> <b>p<sub>4</sub>&gt;0,05</b>

В группе здоровых доноров определялось значительное повышение концентрации TNF- $\alpha$  в супернатантах ФГА-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов по сравнению с интактными культурами клеток (**p=0,03**). Концентрация цитокина в ФГА-стимулированных образцах клеток крови пациентов с аутоиммунными тиреопатиями оказалась

достоверно снижена по сравнению с показателем в стимулированной культуре мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров. Так, содержание TNF- $\alpha$  у больных АИТ с гипотиреозом уменьшалось по сравнению с контрольной группой в 6 раз ( $p=0,005$ ), в фазе эутиреоза – в 8 раз ( $p=0,03$ ).

Таблица 35

Особенности продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатель		TNF- $\alpha$ базальный, пг/мл	TNF- $\alpha$ ФГА- стимулированный, пг/мл
Здоровые доноры (n=30)		47,13 (31,07-206,45)	134,10 (88,22-217,06) $p_1=0,03$
АИТ (n=29)	Гипотиреоз (n=10)	19,12 (15,91-212,72)	23,05 (17,21-40,06) $p_2=0,005$ $p_3>0,05$
	Эутиреоз (n=19)	18,05 (12,73-106,43)	16,36 (15,65-52,34) $p_2=0,03$ $p_3>0,05$
БГ (n=45)	Эутиреоз (n=14)	13,05 (10,90-16,04)	11,95 (10,47-16,07) $p_2=0,002$ $p_3>0,05$
	Гипертиреоз (n=31)	16,51 (12,21-28,44)	12,24 (9,87-20,43) $p_2=0,007$ $p_3>0,05$

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

У пациентов с БГ концентрация TNF- $\alpha$  снижалась относительно значений стимулированной продукции цитокина у здоровых лиц более чем

в 10 раз ( $p=0,002$  в фазе эутиреоза и  $p=0,007$  в состоянии гипертиреоза). При этом концентрация TNF- $\alpha$  в ФГА-стимулированных культурах клеток не отличалась от аналогичного показателя в интактных культурах мононуклеарных лейкоцитов крови полученных от лиц одной клинической группы ( $p>0,05$  во всех случаях) (табл. 35). Это указывает на снижение резервных возможностей клеток к продукции TNF- $\alpha$  как при АИТ, так и при БГ, независимо от уровня тиреоидных гормонов.

Так, при комплексной оценке состояние системы цитокинов IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  у пациентов с тиреопатиями аутоиммунного генеза обращает на себя внимание ряд фактов. Концентрация IL-2 имела минимальные значения у пациентов в состоянии гипотиреоза, в то время как продукция IL-2 *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами, полученными от больных с тиреотоксикозом, значимо возрастала. Помимо этого, для пациентов с БГ, независимо от их тиреоидного статуса, оказалось характерным снижение количества лимфоцитов, несущих рецептор к IL-2 на фоне повышенного количества CD124-презентирующих клеток. Общей чертой для АИТ и БГ было угнетение базальной и стимулированной продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови в условиях *in vitro*, снижение содержания sTNF-R1, а также уменьшение количества в крови лимфоцитов, презентующих мембран-связанный рецептор к TNF- $\alpha$ .

Таким образом, следует отметить, что у пациентов с рассматриваемыми аутоиммунными эндокринопатиями наиболее заметные изменения продукции *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  и отклонения в уровне презентации мембран-ассоциированных рецепторов к указанным цитокинам на циркулирующих лимфоцитах крови наблюдаются в условиях выраженных гормонально-метаболических нарушений: при появлении микроангиопатий у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета, а также при гипо- и гипертиреоидном состояниях у больных аутоиммунными тиреопатиями.

У лиц с БГ показан дефект субпопуляций натуральных киллеров (NK-клеток), который проявляется как снижением спонтанной и стимулированной IL-2 и IFN $\beta$  цитотоксичности, так и нарушением выработки ими цитокинов, в частности TNF- $\alpha$  [Rodien P., 1996; Nielsen N., Odum N., Urso B. et al., 2012]. Субпопуляция натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) способна продуцировать некоторые Th2-цитокины, такие как IL-5, IL-13, которые могут увеличивать активность В-лимфоцитов и косвенно подавлять Th-1 клеточно-опосредованный иммунный ответ. Некоторые исследования показывают, что NK-клетки могут выполнять иммунорегуляторную роль не только за счет продукции определенных цитокинов, но и за счет уничтожения аутореактивных лимфоцитов или других вспомогательных эффекторных клеток, таких как дендритные клетки [Elewaut D., 2000; Wang H.C., Klein J.R., 2001]. Считается, что дефект субпопуляции натуральных киллеров может быть вовлечен в патогенез аутоиммунных заболеваний ЩЖ. Так, ослабление функциональной активности NK может индуцировать распространение и активацию В- и Т-клеточных субпопуляций, за счет усиления Th1 клеточно-опосредованного механизма. Полученные в ходе настоящего исследования данные подтверждают снижение содержания NK-клеток у больных с БГ, что указывает на их вовлеченность в патогенез данных заболеваний, как фактор, способствующий активному развитию аутоиммунного воспаления (табл. 31).

Обнаруженное нами увеличение Т-лимфоцитов в группе больных БГ в стадии тиреотоксикоза также свидетельствует о стимулирующем влиянии тиреоидных гормонов на клеточный иммунный ответ. Кроме этого, в нашем исследовании показано снижение относительного количества натуральных киллеров у пациентов в стадии тиреотоксикоза. Этот факт уже был ранее обнаружен и описан другими исследователями при БГ [Wan Q., McCormick

D.J., 1998]. Однако в настоящее время нет ясной картины относительно эффекта тиреоидных гормонов на показатели врожденного иммунитета.

Исследования, проведенные на лабораторных животных, показывают как ингибирующий, так и стимулирующий эффект терапии тиреоидными гормонами на активность NK-клеток при аутоиммунном воспалении, в зависимости от срока лечения [Botella-Carretero, J. I., 2005]. Также предполагается, что обнаруженное уменьшение цитолитической активности NK связано именно с аутоиммунным процессом, лежащим в основе БГ, вместо того, чтобы непосредственно зависеть от влияния избытка гормонов ЩЖ [Botella-Carretero, J. I. , 2005].

В результате иммуноферментного исследования базальной продукции IL-2 и IL-4 мононуклеарными лейкоцитами, выделенными из периферической крови пациентов с БГ как в фазе тиреотоксикоза, так и в фазе медикаментозного эутиреоза, было зарегистрировано, что продукция данных цитокинов не отличалась от аналогичных параметров в контрольной группе здоровых добровольцев (табл. 32, 33). Только в группе больных с БГ с манифестным тиреотоксикозом незначительно увеличивалась продукция IL-2 ( $p=0,02$ ).

С другой стороны, количество лимфоцитов с комплементарными рецепторами к IL-2, IL-4 изменялось при БГ следующим образом: количество лимфоцитов, несущих CD125+ уменьшалось у пациентов с БГ, независимо от функционального состояния, а количество CD124+-лимфоцитов статистически значимо увеличивалось (табл. 32, 33).

Опираясь на данные литературы, указывающие на увеличение при БГ концентрации растворимого рецептора к IL-2 как в сыворотке крови, так и в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов [J. Jiskra., 2009], можно предположить, что в данном случае имеет место повышенный шеддинг рецепторов к IL-2 с мембраны лимфоцитов. Однако точные механизмы этого процесса не раскрыты. Поскольку взаимодействие IL-2 с



комплементарными ему рецепторами на поверхности лимфоцитов является важным элементом активации клеточного звена иммунного ответа, направленного на деструкцию фолликулярных клеток ЩЖ, то снижение количества CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов при БГ можно рассматривать в качестве фактора, способствующего большей сохранности тиреоцитов при БГ, чем при АИТ.

Очевидно, что CD124<sup>+</sup>-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 определяются повышенный уровень антител к ТПО и рецептору ТТГ. Это указывает на то, что при данном заболевании в ЩЖ сочетаются процессы активации гормон-продуцирующей функции фолликулярных клеток за счет стимулирующего действия аутоантител к рТТГ и гибели тиреоцитов, вызванной анти-ТПО-зависимой цитотоксичностью [Дрометр, Д. А., 2009].

В группе пациентов с БГ количество TNF-R1–презентирующих лимфоцитов значимо снижалось в 2 подгруппах, а также отмечалось достоверное снижение продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами по сравнению с контрольной группой (табл. 34, 35). Эти данные согласуются с результатами других исследователей, отмечающих снижение TNF- $\alpha$  при БГ [Аппельганс, Т. В., 2006]. Известно, что TNF- $\alpha$  играет важную роль в развитии БГ. Так, наряду с IL-2 и IFN- $\gamma$  он участвует в регуляции продукции аутоантител, стимулирует пролиферацию антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов, образуя клоны к различным антигенным эпитопам, а также – синтез гликозаминогликанов в ретроорбитальных фибробластах, способствуя развитию офтальмопатии при БГ. Также при БГ TNF- $\alpha$  усиливает абберантную экспрессию молекул адгезии и HLA II класса на поверхности тиреоцитов, что может способствовать запуску аутоиммунных процессов в ЩЖ, кроме того, TNF- $\alpha$

модулирует функционирование и пролиферацию фолликулярных клеток ЩЖ. Многими авторами показано, что продукция TNF- $\alpha$  лимфоцитами крови больных с БГ была близка к нормальной и возрастала на фоне терапии радиоактивным йодом, а также сывороточная концентрация TNF- $\alpha$  не была увеличена [Jones, B., 1999]. В некоторых исследованиях было обнаружено, что уровни TNF- $\alpha$  мРНК в ткани ЩЖ у больных с БГ были ниже, чем у пациентов с АИТ. По мнению исследователей, дефицит интратиреоидной продукции TNF- $\alpha$  у пациентов с рецидивом БГ соответствует дефициту продукции TNF- $\alpha$  клонами Т-лимфоцитов, изолированных от ЩЖ [Paschke, R., 1993; Aust, G., 1996; Salvi, M., 2000]. 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 ауто-антителопродукции. [Дрометр, Д., 2009]. Этот факт можно рассматривать и как следствие уменьшения количества TNF-R1 – презентирующих лимфоцитов, что было обнаружено нами в ходе исследования (табл. 34).

Увеличение количества лимфоцитов, презентирующих IL-4R, регистрируемое при БГ как в стадии тиреотоксикоза, так и фазе медикаментозно достигнутого эутиреоза, может говорить о поляризации иммунного ответа в сторону Th2. На это также указывает тенденция к увеличению В-лимфоцитов в данной группе, а также снижение количества NK-клеток.

При БГ обнаружено большое количество сильных взаимосвязей (рис.29А), а именно: прямая зависимость уровня IL-2 и объема ЩЖ ( $r=0,482$ ,  $p=0,032$ ), сильная прямая взаимосвязь уровня IL-4 и объема ЩЖ ( $r=0,566$ ,  $p=0,004$ ). Продукция IL-2 значимо коррелировала с уровнями тиреоидных гормонов: положительно с концентрацией  $T_3$  ( $r=0,897$ ,  $p<0,001$ )

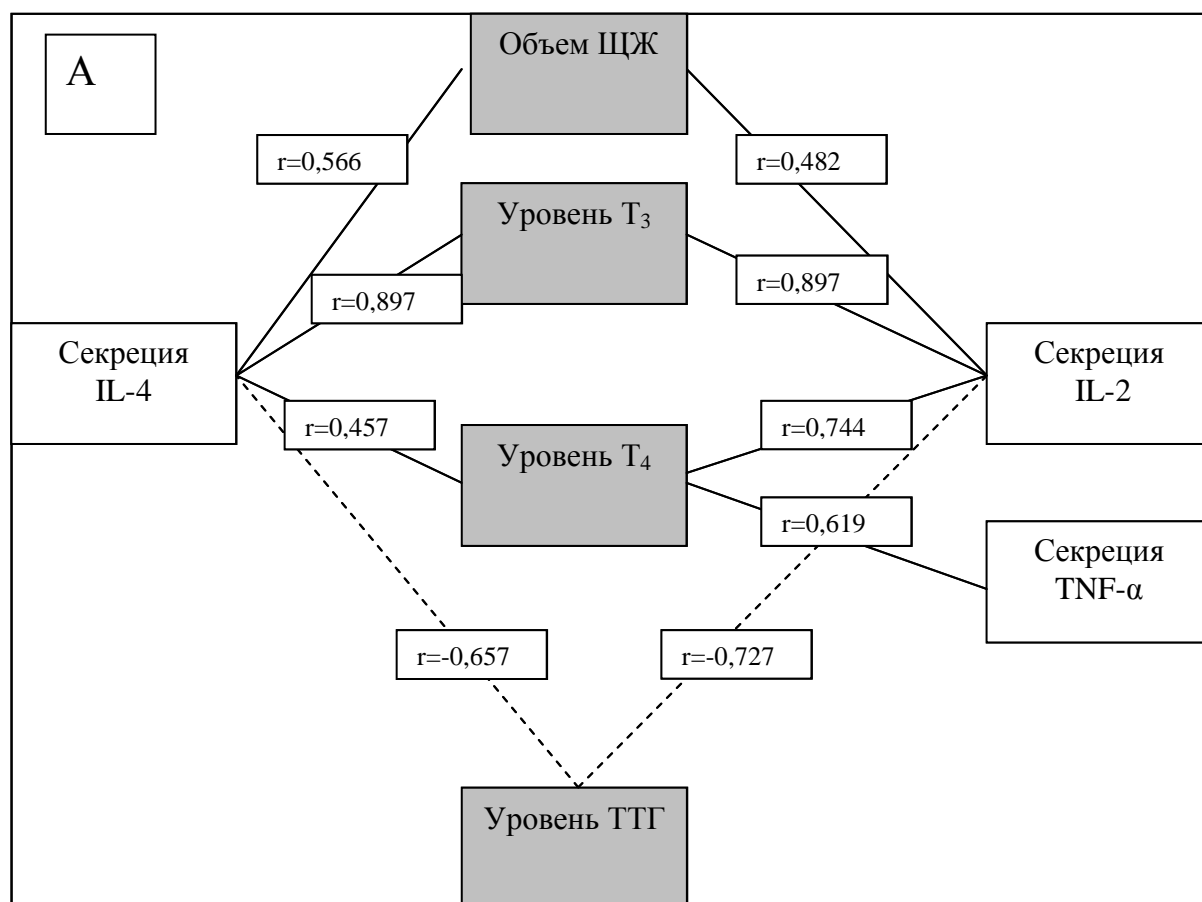
и  $T_4$  ( $r=0,744$ ,  $p<0,001$ ), отрицательно с уровнем ТТГ в сыворотке крови ( $r=-0,727$ ,  $p<0,001$ ). Аналогичные взаимосвязи обнаружены нами между концентрацией IL-4 и показателями концентрации периферических  $T_3$  и  $T_4$ . Так выявлена значимая положительная корреляция между уровнем IL-4 и уровнями свободного  $T_3$  ( $r=0,897$ ,  $p<0,001$ ) и  $T_4$  ( $r=0,457$ ,  $p=0,025$ ), а также отрицательная корреляция с уровнем ТТГ в сыворотке крови ( $r=-0,657$ ,  $p<0,001$ ). Кроме этого определялась сильная прямая зависимость уровня свободного  $T_4$  в сыворотке крови от уровня TNF- $\alpha$  и ( $r=0,619$ ,  $p=0,006$ ).

Данные результаты позволяют предположить, что имеет место косвенное стимулирующее влияние уровня IL-2 на процессы пролиферации клеток щитовидной железы и их функциональную активность, что играет немаловажную роль в патогенезе БГ. Таким образом, очевидно, что IL-2 играет различные роли в патогенезе заболеваний ЩЖ, активируя или угнетая пролиферацию и функционирование клеток ЩЖ через вовлечение в данный процесс различных иммунокомпетентных клеток.

Корреляционный анализ взаимодействий системы IL-4 с показателями функциональной активности ЩЖ в группе пациентов с БГ показал сходные с системой IL-2 взаимодействия. Содержание IL-4 также было положительно связано с объемом ЩЖ и содержанием свободного  $T_3$  и  $T_4$ , отрицательно – с уровнем ТТГ, что говорит о подобном IL-2 стимулирующем влиянии IL-4 на пролиферацию и функционирование тиреоцитов (рис. 29А). Таким образом, IL-2 и IL-4 проявляют некоторый «функциональный» синергизм во влиянии на функциональное состояние щитовидной железы при БГ, что отражает их вовлеченность в иммунопатогенез данного заболевания, но через участие в разных звеньях иммунного ответа на аутоантигены.

При АИТ также регистрировалась прямая корреляционная зависимость между секрецией IL-2 и IL-4 с периферическим уровнем  $T_3$ , но не  $T_4$  (в отличие от БГ, рис. 29Б) и объемом ЩЖ. Данная ассоциация

отражает вклад изучаемых цитокинов в патогенез формирования морфофункциональных изменений ЩЖ при АИТ. Понятной является обратная корреляционная связь между секрецией IL-4 и уровнем ТТГ, так как повышение IL-4 ассоциировано с повышением  $T_3$ , данная взаимосвязь прослеживалась при обоих заболеваниях. При АИТ (в отличие от БГ) не регистрировалось связи секреции IL-4 с периферическим уровнем  $T_4$ , что может отражать механизм тиреотоксикоза при различных АИТП: при БГ-тиреотоксикоз секреторный, при АИТ-деструктивный или тиреотоксикоз «утечки» гормонов из органа-мишени. На схеме (рис. 29Б) отражено также, что при АИТ уровень секреции МНК IL-2 не ассоциирован с подавлением уровня ТТГ, так как степень влияния на уровень периферических тиреоидных гормонов была меньшая, чем при БГ, IL-2 не был ассоциирован с динамикой периферического уровня  $T_4$ .



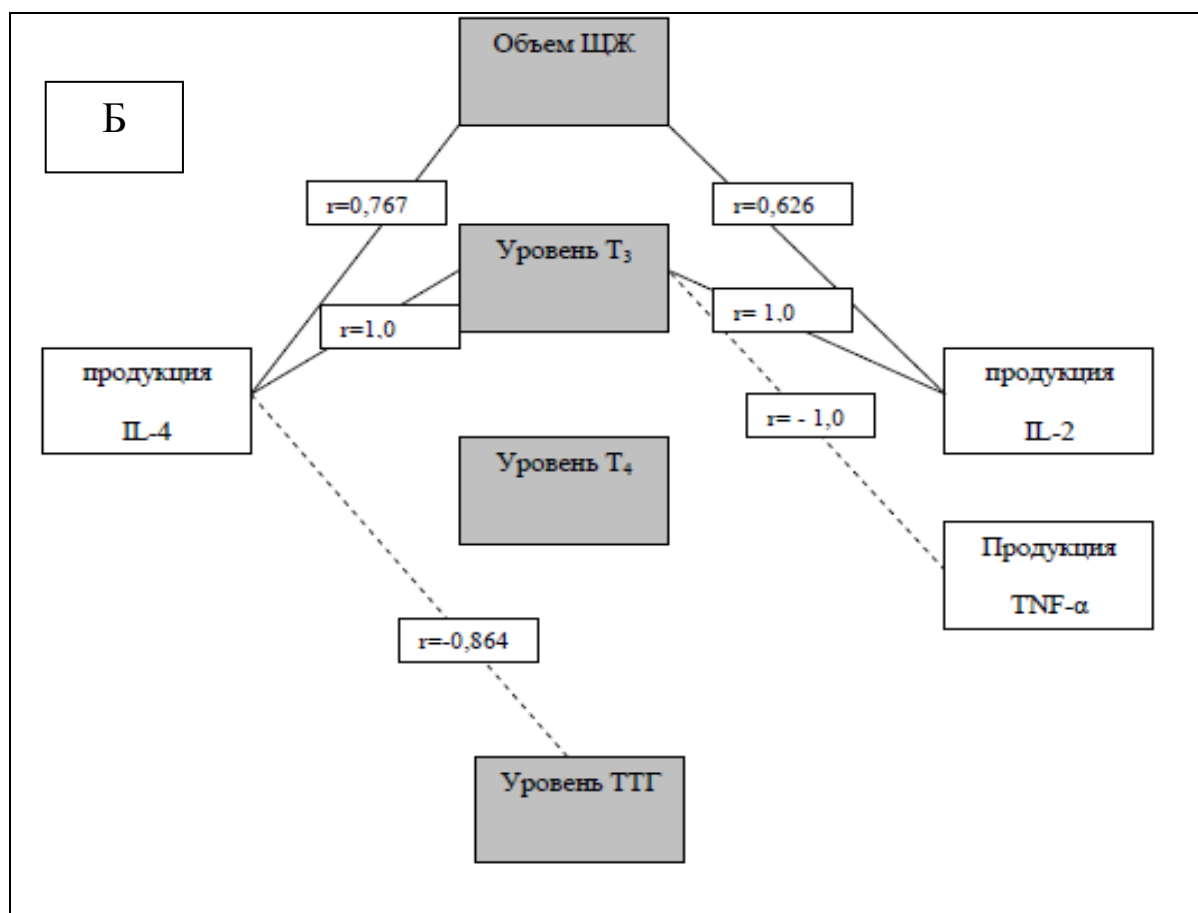


Рис. 29. Корреляционные взаимосвязи иммунологических параметров и параметров, отражающих функционирование щитовидной железы при болезни Грейвса (А) и АИТ (Б)

**Примечание:** сплошной линией обозначены положительные корреляционные взаимосвязи; штрихом – отрицательные.

В отличие от БГ уровень секреции МНК TNF- $\alpha$  при АИТ был ассоциирован не с большим уровнем Т<sub>4</sub>, а с меньшим уровнем Т<sub>3</sub>. Таким образом, при БГ секреция TNF- $\alpha$  связана не с функциональным состоянием ЩЖ, а с механизмами повреждения ткани через ряд цитотоксических реакций клеточного типа, и с динамикой периферического уровня Т<sub>3</sub>, что может быть связано с уменьшением степени повреждения (деструкции) ткани ЩЖ (рис. 29Б).

### Заключение

Существующая ранее модель развития аутоиммунных тиреопатий рассматривает АИТ и БГ как два противоположных по механизму развития

заболевания. Так, аутоиммунный тиреоидит характеризуется развитием клеточного иммунного ответа, в то время как для болезни Грейвса свойственно усиление гуморального звена иммунитета. При этом доминирующей популяцией лимфоцитов в развитии АИТ является Th1-клетки, а при БГ соответственно Th2-лимфоциты [Ajjan, R. A., 2003; Roura-Mir, C., 1997]. Однако, полученные нами данные показывают схожесть иммунологических механизмов, имеющих место при данных патологиях. При этом значимую роль в патогенезе АИТ и БГ играют как компоненты Th1, так и Th2 иммунного ответа, что, несомненно, расширяет существующую модель. Таким образом, различия клинического течения аутоиммунных тиреопатий могут быть отражением дисбаланса Th1/ Th2 иммунного ответа.

#### **4.5. Характеристика экспрессии рецепторов IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$ в ткани щитовидной железы у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (АИТ и БГ) по результатам иммуногистохимического исследования**

Подавляющее большинство исследований, посвященных изучению иммунопатогенеза органоспецифических аутоиммунных заболеваний, имеют существенное ограничение, связанное с методическими трудностями оценки иммунологических реакций в собственно паренхиме органа. Так, огромное количество экспериментальных данных, накопленных в отношении аутоиммунного сахарного диабета, но касающихся изменений системного иммунитета, не может подвести исследователей к разработке эффективных иммуноинтервенционных технологий, поскольку полученные на экспериментальных животных результаты не находят своего подтверждения в клинических испытаниях. Достаточно сложно, иногда невыполнимо, организовать исследование таким образом, чтобы проследить всю цепочку иммунологических изменений со стороны системного иммунитета и одновременно в пораженном органе, учитывая трудность прижизненного морфологического исследования, например, островкового аппарата поджелудочной железы.

Тем не менее, в случае изучения патологии ЩЖ, в ряде случаев можно исследовать то, что происходит непосредственно в органе-мишени и провести некоторые клинико-иммунологические-морфологические параллели, раскрыв, тем самым, некоторые закономерности и особенности органоспецифического аутоиммунного воспаления. В связи с этим нами предпринята попытка гистологического и иммуногистохимического исследования ткани ЩЖ, полученной в ходе оперативного лечения АИТП.

На сегодняшний день нет однозначного мнения о показаниях к хирургическому лечению БГ [Мельниченко Г. А., Лесникова С. В., 2000]. Большинство авторов определяют следующие показания к оперативному лечению:

- 1) зоб больших размеров (более 40 мл);
- 2) БГ в сочетании с узловыми образованиями (более 1,0–1,5 см) в ЩЖ или опухолями;
- 3) наличие выраженных осложнений тиреотоксикоза;
- 4) при неэффективности консервативной терапии;
- 5) непереносимость тиреостатиков;
- 6) если радикального излечения нужно добиться в максимально быстрые сроки;
- 7) пациентам, которые не могут по разным причинам лечиться при помощи других видов терапии;
- 8) больные с эндокринной офтальмопатией;
- 9) дети, молодые женщины, беременные женщины.

Оперативное лечение во всех случаях предпринималось только на основании имеющихся в национальных клинических рекомендациях показаний: рецидивы тиреотоксикоза при БГ, появление узлов на фоне терапии БГ, узловой зоб при АИТ, если имеет место компрессионный синдром или косметический дефект (деформация шеи). Таким образом, мы осознаем, что материал, полученный для морфологического и иммуногистохимического анализа, не претендует на полную репрезентативность для всех вариантов АИТП, однако, может быть использован для получения предварительных данных, связывающих изменения системного иммунитета и клинические особенности (функциональные исходы) с изменениями в органе-мишени.

Аналізу подвергнуто 27 образцов ткани ЩЖ, полученной вследствие проведенных субтотальных или тотальных тиреоидэктомий. Образцы разделены следующим образом:

- 19 образцов пациентов с БГ,
- 4 – с АИТ,
- 4 образца пациентов с многоузловым коллоидным



(неиммунным) зобом - группа сравнения.

Порядок и методология гистологического и иммуногистохимического исследования приведена в главе 2 (пункт 2.2.6.).

В паренхиме ЩЖ в норме лимфоциты отсутствуют. Морфологическим эквивалентом аутоиммунного процесса в ЩЖ является появление иммунокомпетентных клеток в строме органа, в подавляющем большинстве случаев, это лимфоциты. Для того чтобы оценить выраженность лимфоцитарной инфильтрации, предложена классификация Reuber и Glover (1976), согласно которой на основании полуколичественной оценки морфологического состояния ЩЖ выделили 3 степени клеточной инфильтрации: легкая – лимфоциты и плазмциты в строме содержатся в небольшом количестве; умеренная – в строме много лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, многие из которых содержат гемосидерин, определяется очаговая гиперплазия эпителия; тяжелая – в строме много различных клеточных элементов, выраженная десквамация фолликулярного эпителия [Пругло М.Ю. , 2000; Хмельницкий О.К., 2002].

Надо отметить неполное совпадение дефиниций для аутоиммунного тиреоидита с точки зрения морфолога и клинициста, которому вообще не обязательна цитологическая верификация диагноза, а лишь наличие больших диагностических критериев, главным из которых, является развитие манифестного первичного гипотиреоза. Таким образом, диагноз АИТ становится в клинической практике достоверным лишь при одном его функциональном исходе – гипотирозе, тогда как наличие аутоантител к ткани ЩЖ и сонографические признаки АИТ без гипотиреоза позволяют диагноз АИТ считать только вероятным.

С точки зрения морфологического анализа диагноз АИТ верифицирован, когда обнаруживается три признака: лимфоплазмцитарная инфильтрация с образованием лимфоидных фолликулов с герминативными центрами, фиброз и оксифильная метаплазия фолликулярного эпителия.

При отсутствии хотя бы одного из этих признаков патология рассматривается как неспецифический лимфоцитарный тиреоидит [Калмина О.А. , 1995].

Обычно лимфоплазмочитарные инфильтраты при АИТ располагаются диффузно в паренхиме железы, представлены различными клетками, среди которых большое количество плазматических клеток, гистиоцитов. Имеются упоминания о существовании обратной связи между степенью выраженности лимфоидной инфильтрации с одной стороны, и гистофункциональной активностью фолликулярного эпителия и относительным количеством коллоида, с другой [Калмина О.А. , 1995].

С появлением иммуногистохимического метода появилась возможность устанавливать принадлежность клеток к определенному клеточному типу, выявлять специфические особенности и характер внутриклеточной среды. Именно этот метод позволяет исследовать состав клеточных инфильтратов и оценивать функциональное состояние ЩЖ.

Иммуногистохимическое определение типа ИКК при АИТП показало, что в начальных стадиях формирования лимфоидных фолликулов отмечается невысокая насыщенность их Т- и В-лимфоцитами. При дальнейшем прогрессировании процесса принимают участие в равной степени оба типа лимфоцитов. С увеличением степени выраженности лимфоидной инфильтрации возрастает относительное количество интратиреоидных В-лимфоцитов и плазмочитов и уменьшается относительное количество интратиреоидных Т-лимфоцитов. Склеротические процессы ведут к редукции лимфоидной ткани [Пругло М.Ю., 2000].

Одним из основных признаков АИТ является онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия. Впервые термин – онкоциты - предложил немецкий патолог Hamperl (1931) [Hamperl H.Z., 1931]. Он обнаружил в пищеводе среди эпителия слизеобразующих желез особые

крупные клетки с зернистой эозинофильной протоплазмой, которые он назвал онкоцитами от греческого слова «онкустай», что значит «надутые» [Watzka M., 1955].

Раннее считалось, что онкоциты это отмирающие клетки железистого эпителия, которые из-за дегенеративных изменений приобретают характерный вид. Впоследствии онкоциты были найдены во многих органах. Функции онкоцитов до сих пор не выяснены. Присутствие этих клеток в органе считают либо показателем старения, либо патологической трансформации. Некоторые исследователи наблюдают нарастание числа онкоцитов в ЩЖ при старении [Fischer R. , 1961; Резаков Л.П. , 1970; Черствой Е.Д., Неровня А.М., Пожарская В.П. , 1998].

О природе и функциях онкоцитов разными авторами долгое время ведутся дискуссии. Высказывались мнения о том, что онкоциты в эпителии ЩЖ способны к высокой метаболической активности и обладают функциями, связанными с накоплением в них биогенного моноамина – серотонина [Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., 1975; Богин Ю.Н., Маневич Н.А., Шапиро Н.А., 1990]. Также высказывалось предположение о принадлежности онкоцитов к клеткам АПУД-системы [Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., 1975]. Однако отечественные и зарубежные авторы в современных исследованиях не находят подтверждения этой теории [Хмельницкий О.К., Сerezкин Б.С., Хмельницкая Н.М., Третьякова М.С. , 1999; Bejarano P.A., Nikiforov Y.E., 2000; Nesland JM, 1988; Clark OH, 1985; Papotti M, Gugliotta P., 1994].

В ЩЖ их называют клетками Гюртля [P.Caturegli, K.Hurthle, 2005], оксифильными клетками или клетками Ашкенази. Это ацидофильные клетки большего относительного других клеток размера с четкими контурами, просветленной широкой цитоплазмой и большим количеством митохондрий [Nasuti J, Benedict C, 1999]. Размеры этих клеток варьируются, а ядра могут быть как гиперхромными, так и просветленными

(гипохромными), напоминая ядра клеток при папиллярной карциноме [Rosai J., 2004]. Кроме полиморфизма ядра отмечается увеличение размера ядрышек в этих клетках [Nasuti J, Benedict C, Hurford M. et al., 1999]. При световой микроскопии наличие ацидофильной цитоплазмы с гранулами является одним из отличительных признаков онкоцитов [Nasuti J, Benedict C, Hurford M. et al., 1999]. Феномен диффузной эозинофилии, которая сосредоточена в цитоплазме, присущ только онкоцитам [Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А. , 1975].

Большое количество онкоцитов появляется в ткани ЩЖ именно при АИТ, как правило, эпителий с оксифильной дегенерацией окружен лимфоцитами. При неспецифическом лимфоцитарном тиреоидите число онкоцитов невелико, или они вовсе не обнаруживаются [LiVolsi V.A. , 1990].

Как уже было описано в главе 3 и 4, у пациентов с рассматриваемыми аутоиммунными эндокринопатиями наиболее заметные изменения продукции *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  и отклонения в уровне презентации мембран-ассоциированных рецепторов к указанным цитокинам на циркулирующих лимфоцитах крови наблюдаются в условиях выраженных гормонально-метаболических нарушений: при появлении микроангиопатий у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета, а также при гипо- и гипертиреоидном состояниях у больных аутоиммунными тиреопатиями.

Участие цитокинов в аутоиммунных реакциях несомненно, так как презентация антигена антиген-презентирующими клетками (АПК), функционирование Т- и В-лимфоцитов обязательно сопровождается продукцией различных цитокинов, определенным образом влияющих на клетки-мишени. Считается, что цитокины играют принципиальную роль в индукции и поддержании иммунологической толерантности, и продуцируются не только лимфоцитами, инфильтрирующими щитовидную железу, но также клетками эндотелия и клетками фолликулярного эпителия

[Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002]. Кроме иммуномодулирующего эффекта, цитокины способны регулировать пролиферацию, процессы апоптоза фолликулярного эпителия, а также изменять функциональную активность тиреоцитов, влияя на экспрессию рецептора ТТГ, работу NIS; оказывать прямое воздействие на гормональную активность тиреоидных клеток, стимулировать лимфоидную инфильтрацию щитовидной железы [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002], а значит влиять на клиническое течение заболеваний. В частности, поддержание воспаления в ЩЖ либо его разрешение, зависит от баланса про- и противовоспалительных цитокинов и их рецепторов, в частности, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002].

Экспрессия мРНК цитокинов исследовалась с помощью различных методов, включая вестерн-блоттинг, слот-блоттинг и RT-PCR. Была показана экспрессия генов IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и различных хемокинов в образцах ткани щитовидной железы при болезни Грейвса и АИТ. Однако оказалось, что экспрессия генов не всегда коррелирует с продукцией самого белка. Иммуногистохимически определена локализация продукции того или иного цитокина в ткани ЩЖ. Показано, что IFN $\gamma$  продуцируется лимфоцитами, инфильтрирующими строму железы, IL-1 клетками эндотелия, IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  непосредственно клетками фолликулярного эпителия (табл. 36).

Известно, что в щитовидной железе как больных болезнью Грейвса (БГ), так и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), обнаруживается лимфоидная инфильтрация. Большинство интратиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса – это Т-лимфоциты, а В-клеточные скопления встречаются гораздо реже, чем, например, при АИТ. Деструкция фолликулов, характерная для АИТ, отсутствует. Чем больше выражена очаговая лимфоидная инфильтрация, тем большими оказываются рост и пролиферация тиреоцитов. Найдена корреляция между степенью

лимфоидной инфильтрации щитовидной железы при БГ и экспрессией маркера пролиферации Ки-67 (Ki-67) на тиреоцитах.

Таблица 36

Продукция цитокинов в ткани щитовидной железы  
(по Weetman A. P., Ajjan R. A., 2002)

цитокин	источники продукции	функциональные эффекты цитокинов
IL-1	эндотелиоциты, моноциты	- стимулирует пролиферацию тиреоцитов (эффект зависит от ТТГ) - ингибирует NIS/захват йода
IL-2	лимфоциты	
IL-4	лимфоциты	
IL-6	лимфоциты фолликулярный эпителий	увеличивает пролиферацию тиреоцитов (эффект зависит от ТТГ)
IL-8	лимфоциты фолликулярный эпителий	
IL-10	экспрессия мРНК	
IL-12	экспрессия мРНК	
IL-13	экспрессия мРНК	
IL-14	экспрессия мРНК	
IL-15	экспрессия мРНК	
IL-16	экспрессия мРНК	
IL-17	экспрессия мРНК	
IFN $\gamma$	лимфоциты	- угнетает пролиферацию тиреоцитов - ингибирует NIS/захват йода - модулирует экспрессию гена рецептора ТТГ
TNF- $\alpha$	лимфоциты фолликулярный эпителий	- угнетает пролиферацию тиреоцитов - ингибирует NIS/захват йода
TGF $\beta$	лимфоциты фолликулярный эпителий	

В отличие от АИТ, среди клеток лимфоидного инфильтрата при БГ преобладают так называемые Т-хелперы 2 типа (а не Т-хелперы 1 типа или цитотоксические Т-лимфоциты), которые секретируют в основном IL-4 и

стимулируют продукцию антител В-лимфоцитами. При других же аутоиммунных заболеваниях активируются в основном Т-хелперы 1 типа, которые секретируют главным образом IFN $\gamma$  и стимулируют цитотоксические реакции.

БГ развивается на фоне практически полной сохранности органа-мишени, АИТ клинически проявляется лишь после разрушения большей части щитовидной железы. Показано, что тиреоциты больных с БГ (в отличие от нормальных клеток ЩЖ и тиреоцитов больных с АИТ) устойчивы к повреждающему действию собственных сывороточных факторов. Нашли, что эта устойчивость связана с потерей рецепторов (в частности Fas-рецептора), опосредующих гибель тиреоцитов путем апоптоза [Кандрор В.И., 2008].

Согласно последним исследованиям в этой области IL-2 и IL-4 в тканях ЩЖ выявляется только в связи с присутствием лимфоидной инфильтрации, точно неизвестно способен ли фолликулярный эпителий продуцировать эти цитокины и имеет ли рецепторы к этим цитокинам. Поэтому вклад иммунорегуляторных цитокинов Th1 и Th2-лимфоцитов, локализованных непосредственно в ЩЖ, в формирование АИТП не уточнен (табл. 37).

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

Морфофункциональные признаки, определяющие **снижение функциональной активности щитовидной железы**: увеличение размеров фолликулов, уменьшение высоты клеток фолликулярного эпителия, ядра фолликулярного эпителия на срезе вытянутые, эндотелиоподобной формы с расположением большой оси параллельно базальной мембране, отсутствие пролиферации фолликулярного эпителия, отсутствие слущивания клеток

фолликулярного эпителия, присутствие большого количества интрафолликулярного коллоида, коллоид компактный, часто глыбчатый, отсутствие краевой вакуолизации, окраска коллоида эозином в красный цвет; малое содержание межфолликулярного эпителия, склероз стромы, мембраны капилляров, окружающих фолликулы, уплотнены (рис. 32-33).

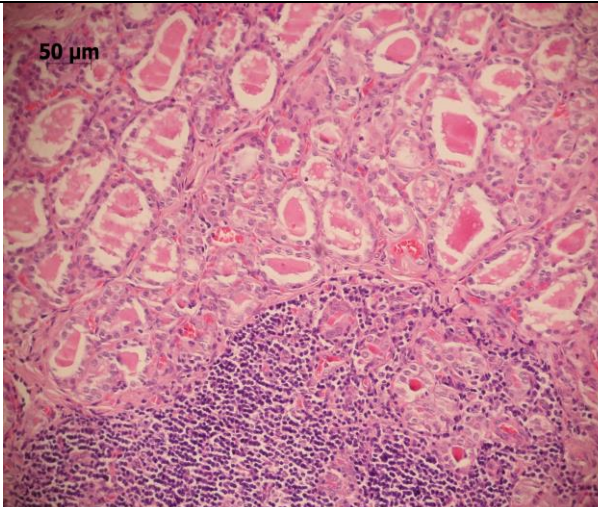
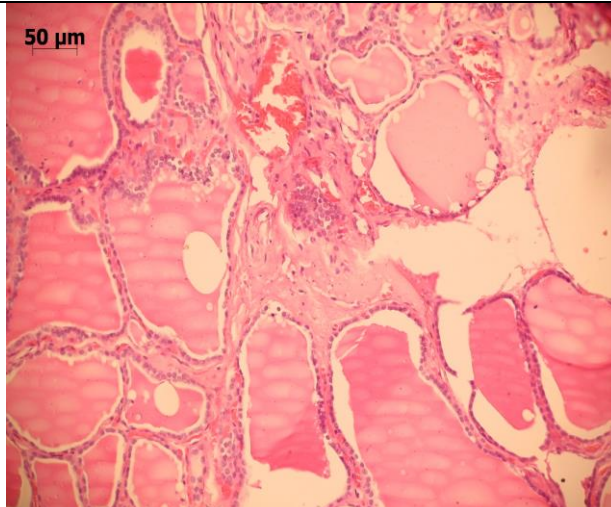
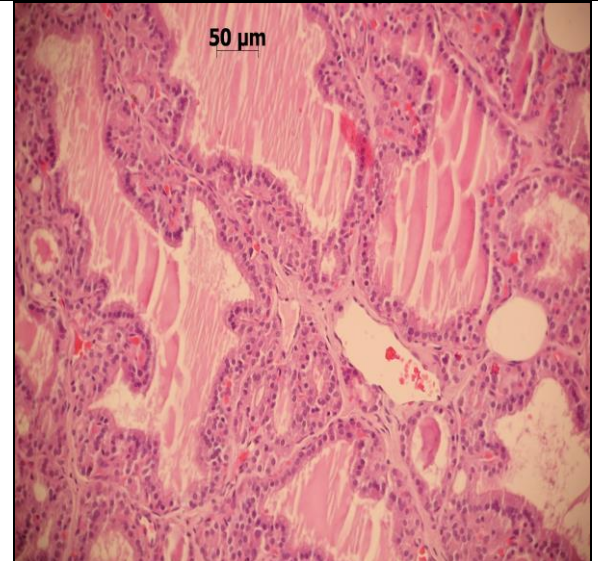
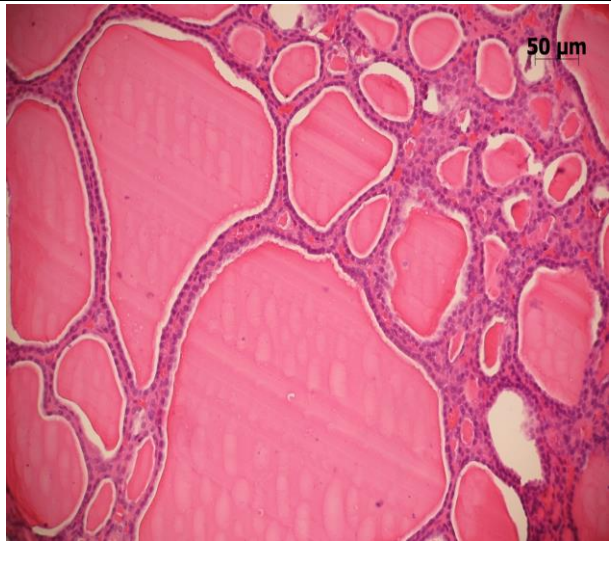
Таблица 37

Спектр цитокинопосредованных эффектов на щитовидную железу  
(по данным A. P. Weetman, R. A. Ajjan)

<b>Провоспалительные свойства</b>	<b>Протективные эффекты</b>	<b>Функциональные эффекты</b>
Влияние на экспрессию МНС I и II класса	Влияние на экспрессию МНС I и II класса	Модуляция скорости пролиферации фолликулярного эпителия
Экспрессия молекул адгезии	Защита от клеточно-опосредованной цитотоксичности	Снижение экспрессии гена NIS, захвата и органификации йода
Стимуляция продукции простагландина, NO и цитокинов	Защита от комплемент-зависимой цитотоксичности	Уменьшение экспрессии ТПО и рецептора к ТТГ
Предрасположенность к апоптозу	Снижение пролиферации Т-лимфоцитов и распознавания ауто-антигенов	Уменьшение продукции тиреоглобулина и органификации йода

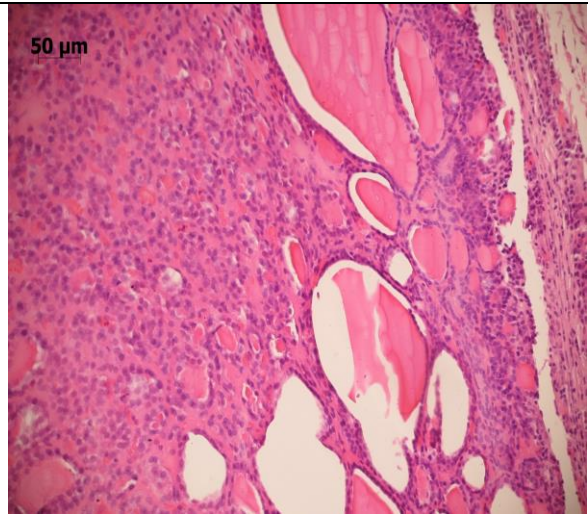
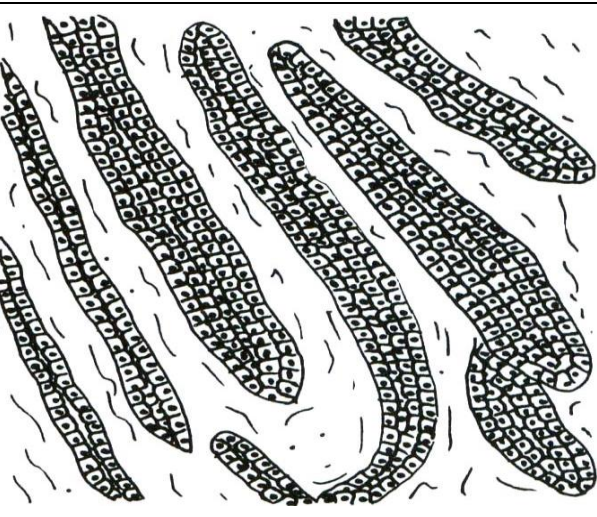
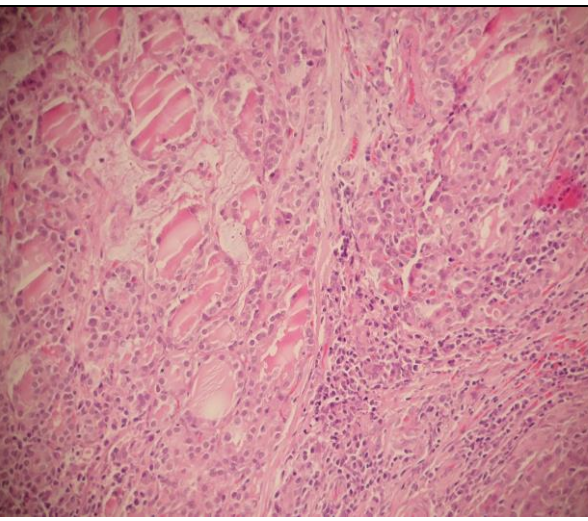
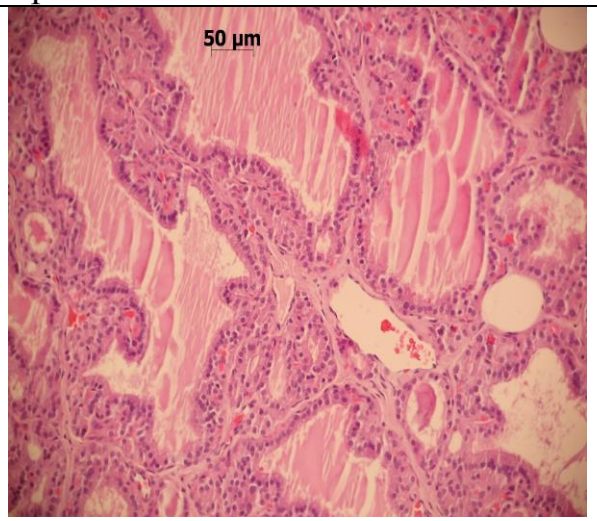
Морфофункциональные признаки, определяющие **повышение функциональной активности щитовидной железы**: уменьшение размеров фолликулов, увеличение высоты клеток фолликулярного эпителия, ядра фолликулярного эпителия округлой формы с расположением большей оси перпендикулярно базальной мембране, наличие пролиферации фолликулярного эпителия.



<p>Мелкофолликулярный тип строения. Размеры фолликулов до 100 мкм.</p>	<p>Среднефолликулярный тип строения. Размеры фолликулов от 100 до 200 мкм.</p>
	
<p>Крупнофолликулярный тип строения. Размеры фолликулов от 200 до 300 мкм.</p>	<p>Смешанный нормопластический тип строения с разными размерами фолликулов.</p>
	

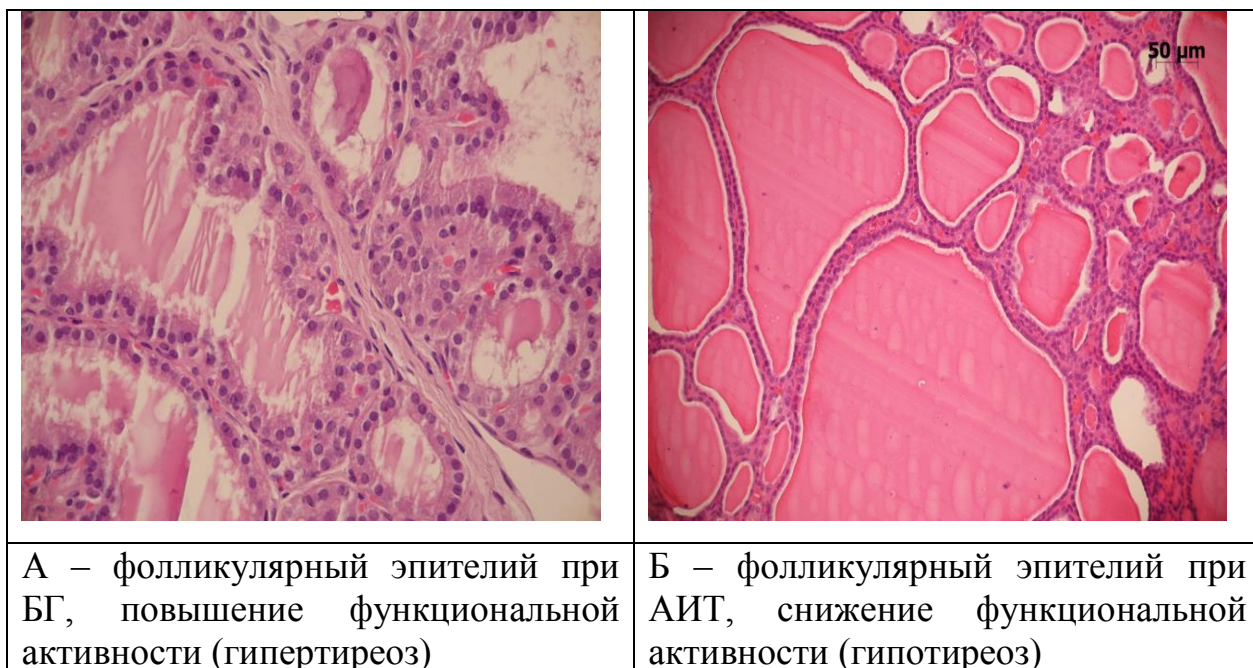
**Рис. 30.** Варианты (типы) строения ЩЖ (нормопластический тип строения). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 150.



Фолликулярный эпителий в виде полей и пластов	Тубулярный тип строения
	
Мелкофолликулярный тип строения	Смешанный паренхиматозный тип строения
	

**Рис.31.** Варианты (типы) строения ЩЖ (паренхиматозный тип строения). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 150.

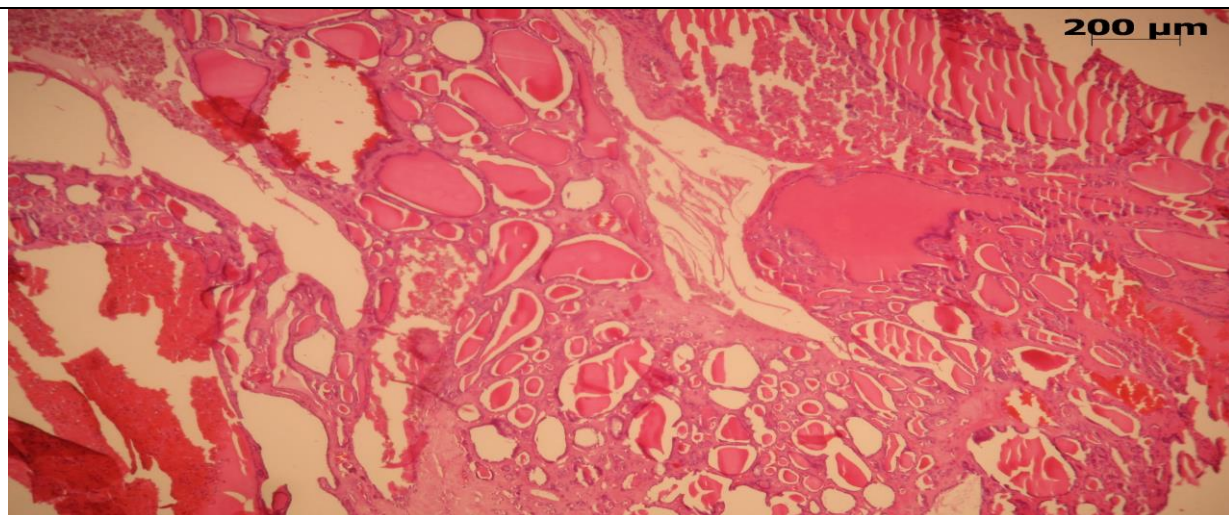




**Рис. 32.** Гистологические признаки дистиреоза ЩЖ

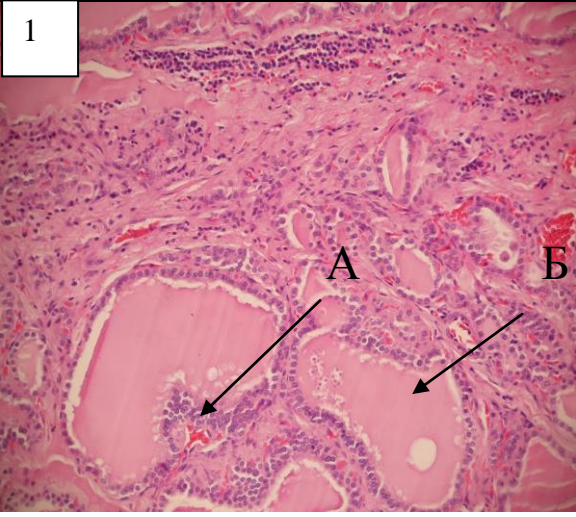
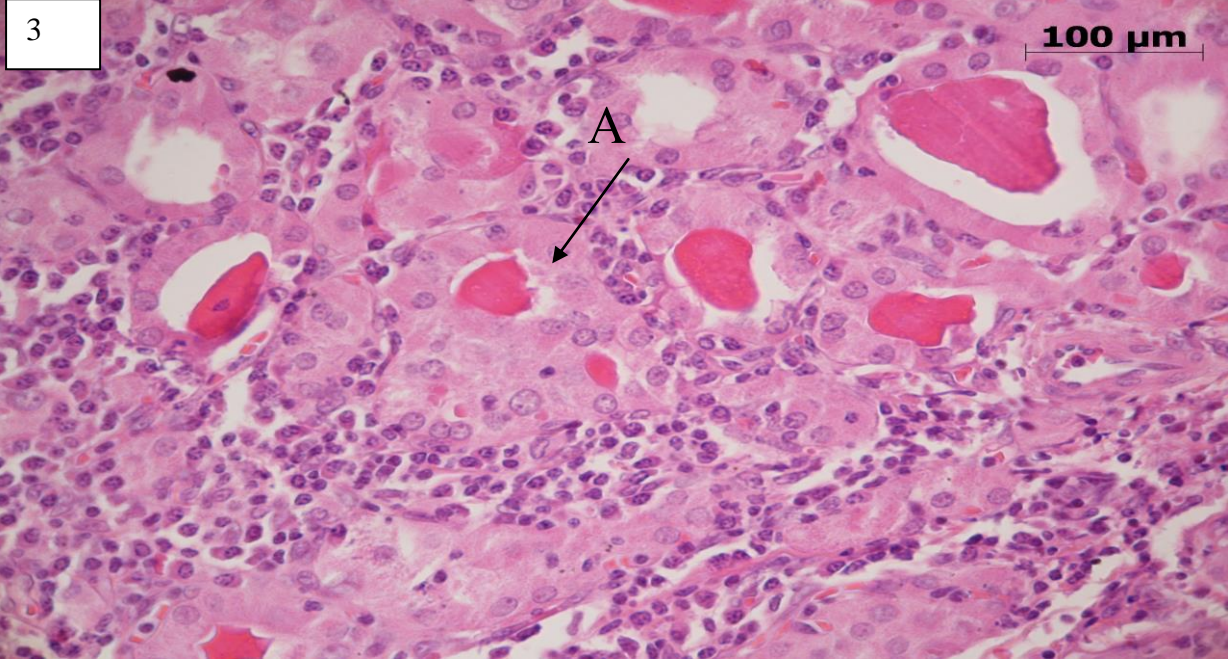
Окраска гематоксилином и эозином, ув. 150

Смешанный крупнофолликулярно-кистозный



**Рис. 33.** Варианты (типы) строения ЩЖ (коллоидный тип строения).  
Окраска гематоксилином и эозином, ув. 50



<div data-bbox="268 168 343 241" data-label="Text">1</div> 	<div data-bbox="1428 168 1503 241" data-label="Text">2</div> 
<p>А–пролиферация интрафолликулярного эпителия, образование многослойных подушек «сандерсена», складки симулирующие сосочки Б-Коллоид жидкий, бледно-окрашивающийся, или совсем неокрашенный, пенистый по краям, резорбция коллоида</p>	<p>А–пролиферация экстрафолликулярного эпителия, увеличение количества и объема островков тиреоцитов между фолликулами среди клеток происходит накопление коллоида формирование мелких фолликулов, затем более крупных</p>
<p>Окраска гематоксилином и эозином, ув. 150</p>	
<div data-bbox="268 1137 367 1211" data-label="Text">3</div> 	
<p>А – фолликулы с клетками Ашкенази (круглые клетки с эозинофильной зернистой цитоплазмой и большим ядром) на фоне экстрафолликулярной гиперплазии эпителия у пациента с БГ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400</p>	



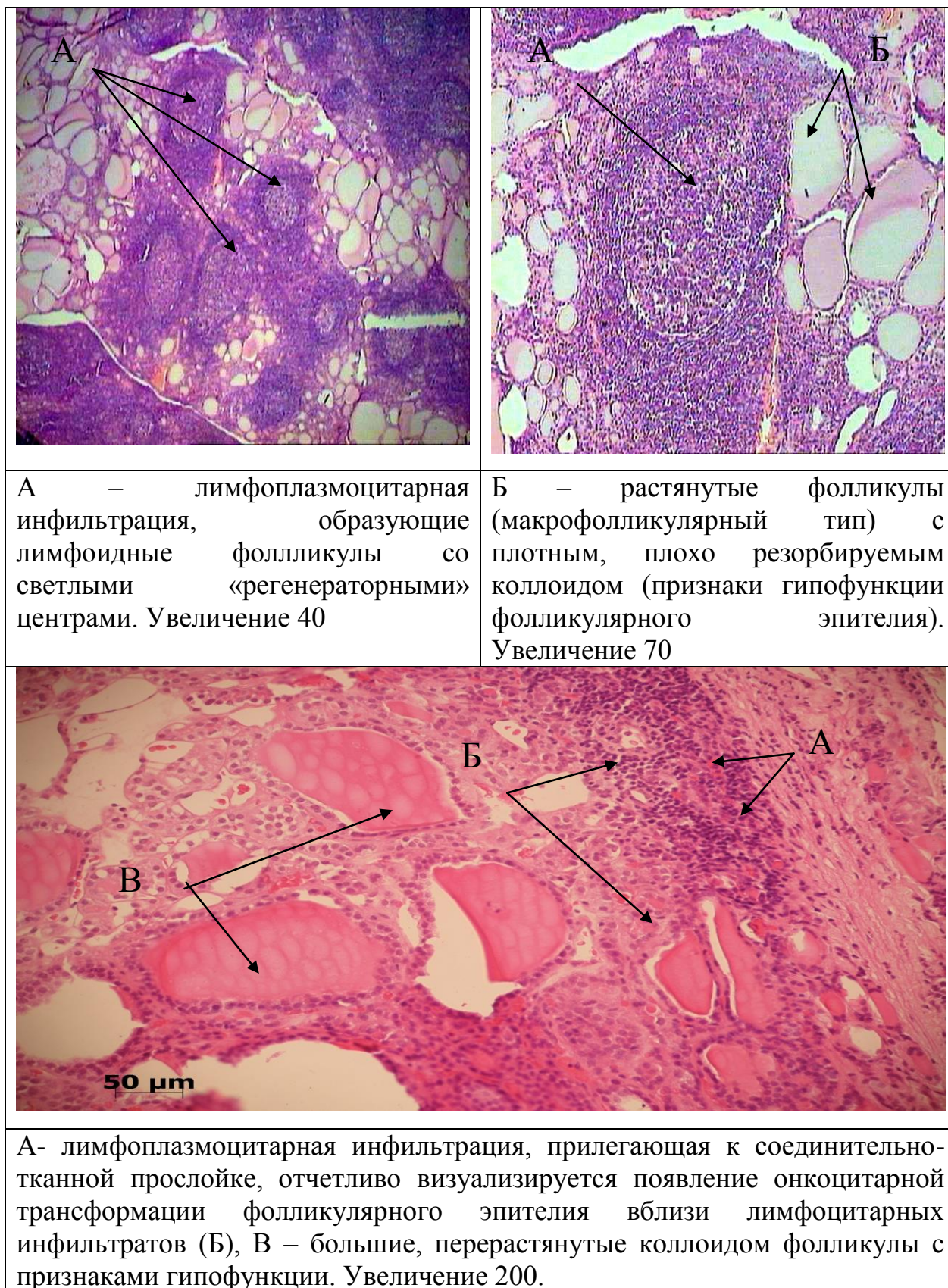


неокрашенный, пенистый по краям, полное отсутствие коллоида в фестончатых фолликулах свидетельствует об усиленном выведении гормонов, а также - «коллоидный отек» - жидкий коллоид в межклеточной ткани.

**Гистологические изменения при АИТ включали:** сплошная лимфоплазмочитарная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов (при диффузной форме иногда с почти полной утратой фолликулов из тироцитов); Гюртле-клеточная реакция, скопление клеток Ашкенази; проявления регенераторного роста (небольшие островки светлых клеток с микрофолликулами, пласты базофильных клеток без образования фолликулов, очаги гиперплазии из клеток Ашкенази, формирующие фолликулы и даже сосочковые фигуры), различной степени выраженности процессы фиброзирования стромы.

Известно, что постоянной чертой АИТП является лимфоцитарная инфильтрация, часто достигающая значительных размеров и организованная в виде лимфоидных фолликулярных структур, содержащих зародышевые центры. Эти структуры названы третичными лимфоидными органами (ТЛО). Совсем недавно испанскими исследователями доказано [Maria-Pilar Armengol et al., 2003], что зародышевые центры, расположенные внутри железы, являются функциональными, вырабатывают специфические антитела к антигенам ЩЖ и что фолликулярные тиреоидные клетки вырабатывают хемокин SDF (CXCL12). Кроме того, наблюдалось интенсивное образование венул с высоким эндотелием и обособление В- и Т-клеточных областей.





**Рис.35.** Инфильтрация ткани щитовидной железы. Гистологические изменения у пациента с АИТ, первичным манифестным гипотиреозом, тяжелой степени тяжести.

Роль тимуса и центральной толерантности в профилактике аутоиммунной реакции к периферическим аутоантигенам недавно была пересмотрена. Полученные данные позволяют предположить существование центрального механизма толерантности в отношении тиреоидных аутоантигенов ТПО, ТГ и рТТГ. Существование центральной толерантности к тиреоидным антигенам ставит вопрос, является ли присутствие аутореактивных лимфоцитов в железе при АИТП результатом экспансии низкоаффинных клеток, ускользнувших от действия центральной толерантности задолго до начала заболевания, или же оно служит результатом воздействия клеток, избежавших отрицательного отбора в процессе дифференцировки в тимусе, подвергшемся частичной инволюции. Вопрос остается открытым, то есть, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

При оценке гистологического строения ткани ЩЖ при БГ учитывали, что выделяют при данном заболевании 3 гистологических варианта (Пругло М.Ю., 2000; Хмельницкий О.К., 2002):

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

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

- Третий (так называемый коллоидный пролиферирующий зоб) – с усиленной пролиферацией тиреоидного эпителия («сандерсеновские подушечки» или сосочкообразные выросты), эпителий кубический, лимфоидная инфильтрация сочетается с трансформацией тиреоидного эпителия в клетки Ашкенази. В нашей выборке наиболее часто встречался 2 гистологический вариант – 50%, классический – в 25% случаев и третий – в



9% случаев. В 16% у пациентов с БГ наблюдалось сочетание 2 и 3 гистологических вариантов.

При сопоставлении клинико-инструментальных данных пациентов с БГ с вариантом гистологического строения ЩЖ отмечено преобладание классического варианта с формированием «псевдососочков» и «подушек сандерсена» у пациентов с БГ с большим объемом зоба: так медиана объема ЩЖ у пациентов с 1 гистологическим вариантом составила 55,3 (42-64) мл, со вторым вариантом- 32,0 (18,3-36,9) мл, с 3-м и смешанным (2-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 мы сталкиваемся с различными механизмами перестройки ткани, вследствие воздействия различных по механизму иммунологических реакций в ткани ЩЖ при АИТП.

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 тот факт, что степень пролиферативных процессов сопряжена с выраженностью гипертиреоза при БГ.

Уровень специфических для БГ аутоантител (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 к 3-му варианту: у пациентов с 1-м типом составлял 397,4 (31,9-762,0) МЕ/л, со 2-м – 541,7 (273,3-806,5) МЕ/л и с 3-им - 990,1(824,2-

1156,0 МЕ/л) соответственно. Данный факт наводит на мысль, что при клиническом диагнозе БГ не исключено сочетание двух аутоиммунных заболеваний - АИТ и БГ одновременно, в ткани железы происходит взаимодействие иммунологических реакций, проявляющихся в морфофункциональных реакциях ткани, которые подчас носят полярный, взаимно уравнивающий характер: при меньшей выраженности АИТ происходит более выраженная базедофикация ткани, проявляющаяся 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 клинко-морфологические параллели подтверждают давние наблюдения клиницистов, о том, что сочетание АИТ и БГ более благоприятно в плане тяжести проявлений и возможности стойкой медикаментозной и спонтанной ремиссии аутоиммунного тиреотоксикоза.

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

иммунологических и морфологических предикторов исхода данных патологий.

Медиана стажа заболевания у пациентов с 1-м гистологическим вариантом БГ составила 2 года (0,8-2,5 года), а со вторым – 4 года (0,5-8,0 лет) и 3-м – также 4 года (2,2-6,5 лет;  $p < 0,05$ ), что также косвенно отражает тяжесть заболевания, выраженность синдрома тиреотоксикоза, что явилось показанием для радикального хирургического лечения аутоиммунного тиреотоксикоза. Современные клинические рекомендации указывают на необходимость радикального излечения БГ (оперативное лечение или радиоiodтерапия) после 2 лет тиреостатической терапии, если стойкая ремиссия заболевания не была достигнута. Поэтому обращает на себя внимание столь большой стаж БГ (максимально 10 лет) у некоторых пациентов, прежде чем они были подвергнуты оперативному лечению. Видимо произошло изменение существующих рекомендаций в связи с мягким, «доброкачественным» течением аутоиммунного тиреотоксикоза, ориентации клиницистов на возможное развитие ремиссии БГ при сочетании ее с высокими титрами АТ к ТПО, что для врача-клинициста всегда указывает на АИТ, отсутствием выраженного зобогенеза, а в ряде случаев и уменьшении объема ЩЖ на фоне проводимой медикаментозной терапии.

Нашими результатами показано, что подавляющее большинство пациентов 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 гистологическим вариантом преобладали мужчины (62%,  $\chi^2 = 5,7$ ,  $p < 0,05$ ), в то время как пациенты с 1 вариантом были только женщины (100%), что несколько противоречит

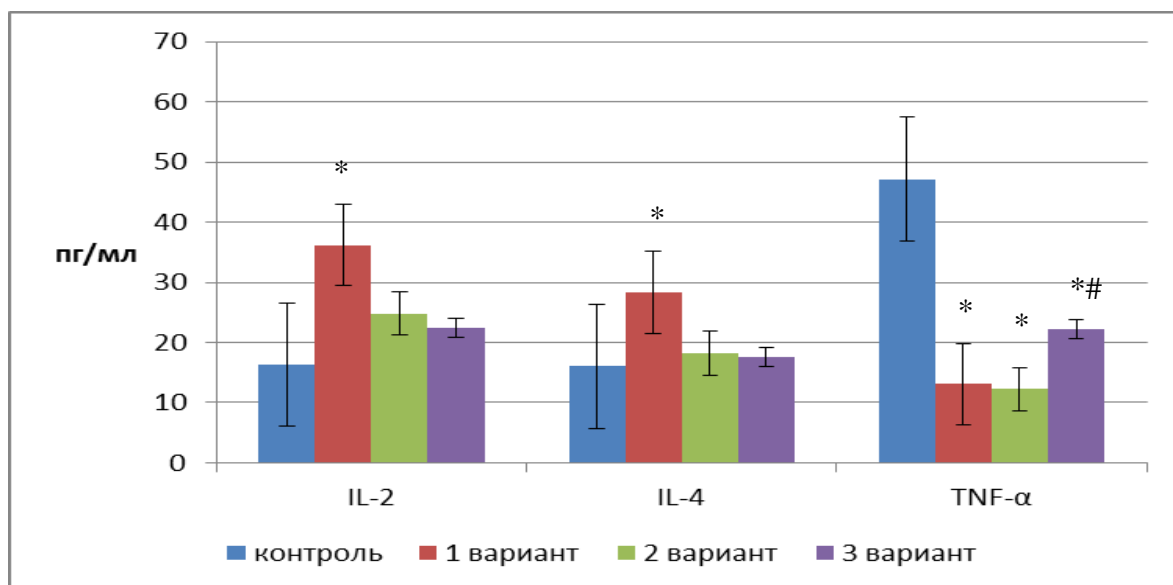
установленной ранее закономерности более тяжелого течения тиреотоксикоза у мужчин, но хорошо согласуется с известной закономерностью меньшей вероятности ремиссии БГ на фоне консервативной терапии у мужчин. Узловые образования фиксировались с одинаковой частотой при обоих гистологических вариантах БГ ( $p>0,05$ ).

При анализе цитокинпродуцирующей активности культуры мононуклеарных лейкоцитов зарегистрирован более высокий уровень продукции IL-2 и IL-4 при 1-м гистологическом варианте («классический» тип течения БГ), что отражает взаимосвязь функциональной активности иммуноцитов с клинико-морфологическими проявлениями заболевания (рис. 36), т.к. многими исследователями фиксировался факт сопряженности гиперцитокинемии (IL-2, IL-4) с выраженностью гипертиреоза и объемом зоба при БГ [Кравец Е.Б., Уразова О.И., Недосекова Ю.В., 2010].

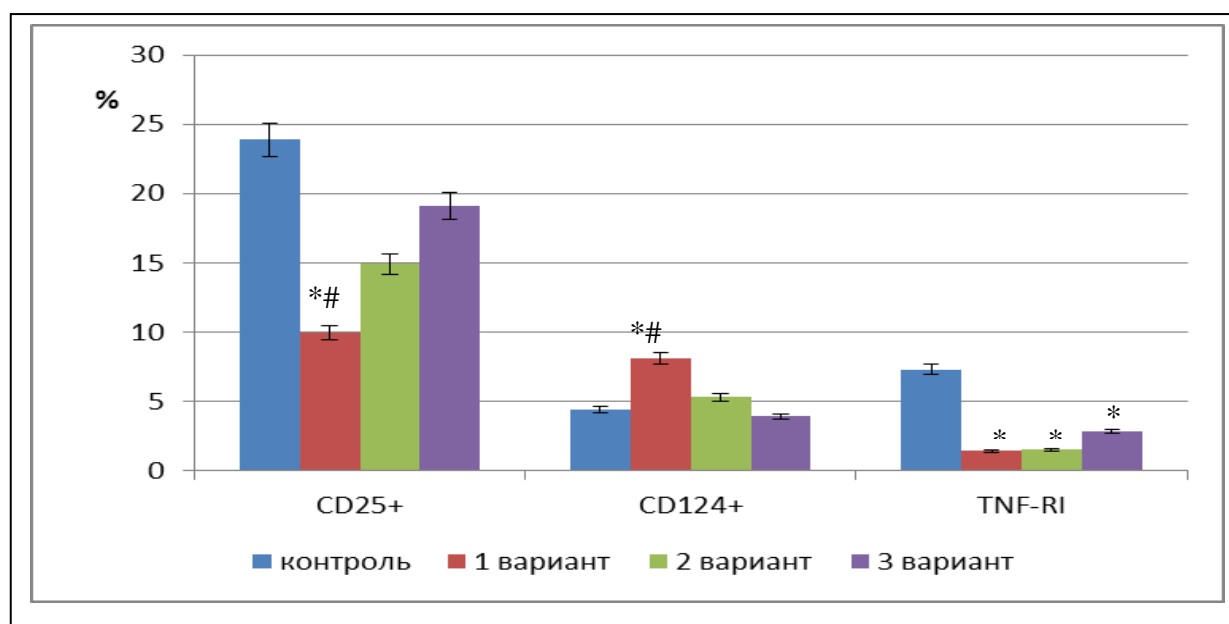
Количество экспрессирующих комплементарные изучаемым цитокинам рецепторы лейкоцитов превышало контрольные значения только при 1-м варианте БГ и касалось лейкоцитов, экспрессирующих CD124+.

Максимальная продукция TNF $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови регистрировалась в подгруппе пациентов с БГ 3-м гистологическим вариантом, количество экспрессирующих TNF-R1 лейкоцитов было максимальным также в подгруппе больных БГ с 3-м вариантом строения ткани, где имела место онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия (рис. 36).

В нашей стране около 40% больных БГ подвергаются оперативному вмешательству, так как консервативная терапия сопряжена с риском рецидива заболевания – до 63% случаев [Мельниченко Г. А., Лесникова С. В. , 2000], особенно в случае тяжелого течения БГ [Петрова Н.Д., Хомякова В.Н., Мельниченко Г.А. , 2000].



А



Б

Примечание: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля,  
# -  $p < 0,05$  в сравнении со значениями групп сравнения

**Рис. 36.** Цитокинсекретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов крови (А) и количество лейкоцитов, несущих комплементарные рецепторы (Б) у пациентов с различными гистологическими вариантами болезни Грейвса.

Однако довольно часто (до 40% случаев) и после хирургического лечения БГ, если не выполняется тиреоидэктомия, возникает рецидив заболевания [Балаболкин М.И., Ветшев П.С., Петунина Н.А., Трухина Л.В.,

2000; Дедов И.И., 2000]. Поэтому многими исследователями подчеркивается важность поиска прогностических факторов, позволяющих предупредить возможный рецидив заболевания и, следовательно, выбрать наиболее оптимальный способ лечения БГ для конкретного больного уже в дебюте заболевания [Лазанович В.В., Маркелова Е.В., 2008].

Этими же авторами проведено исследование концентрации иммунорегуляторных цитокинов в сыворотке крови пациентов с БГ на различных этапах течения заболевания и выяснено, что в дебюте аутоиммунного тиреотоксикоза отмечаются наибольшие значения как провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN- $\gamma$ ), так и противовоспалительных (IL-10) цитокинов, которые достоверно снижались на фоне терапии тиамазолом, за исключением случаев тяжелого течения заболевания. Прогностически неблагоприятными факторами рецидива заболевания являлись высокие сывороточные уровни антител к рецептору ТТГ, IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  в предоперационном периоде [Лазанович В.В., Маркелова Е.В., 2008].

Применив несколько другой подход (определение цитокинпродуцирующей и рецептирующей функции мононуклеарных лейкоцитов в сравнении с морфологическими вариантами перестройки ЩЖ и показателями иммуногистохимической детекции рецепторов к изучаемым цитокинам) мы сделали попытку установить клинико-иммунологические и морфологические параллели для определения значимости изучаемых иммунологических параметров в патогенезе АИТП.

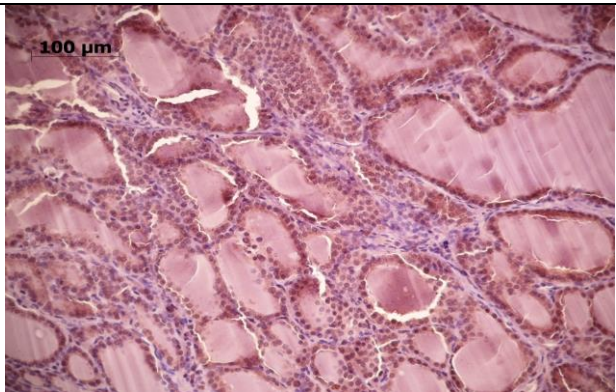
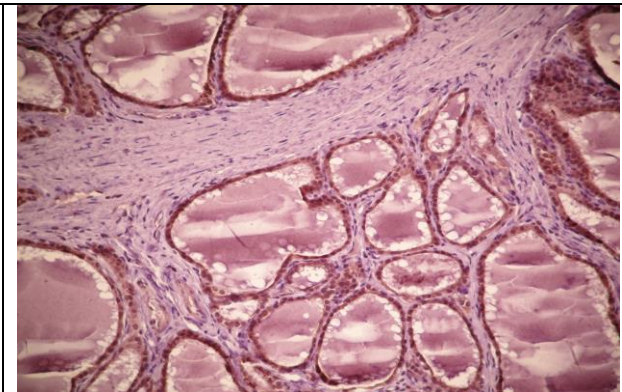
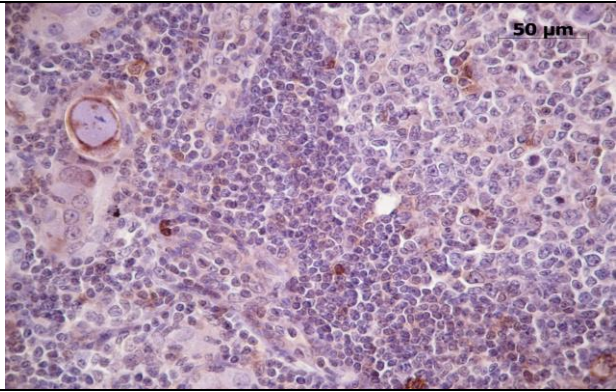
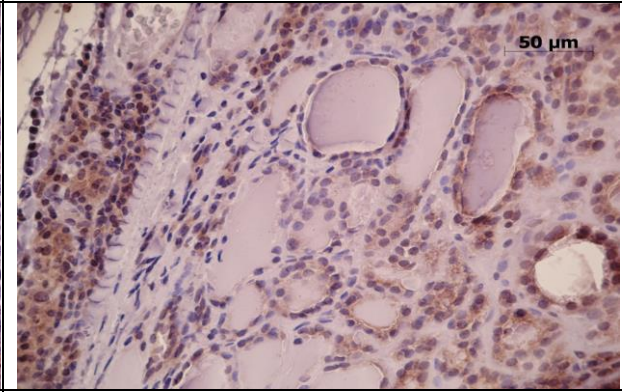
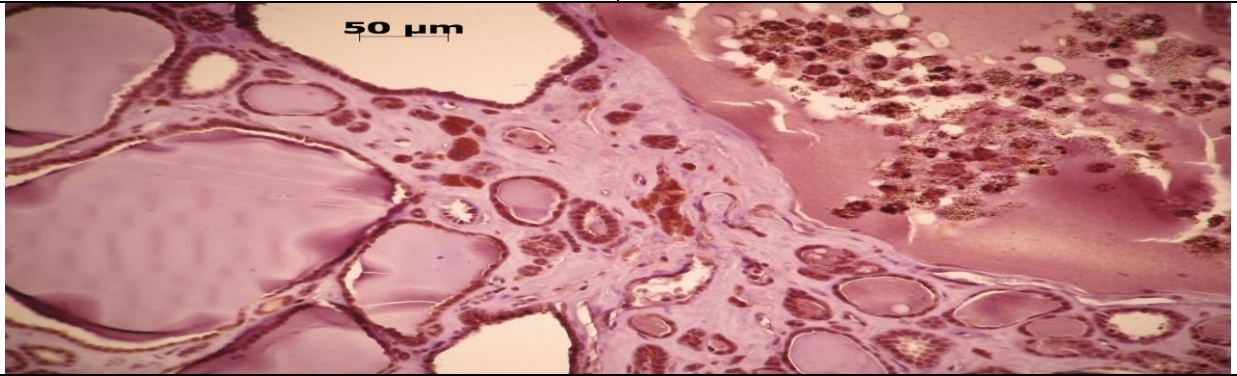
Установлено, что рецепторы к IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$  экспрессируются как инфильтрирующими ЩЖ лимфоцитами и моноцитами, так и фолликулярным эпителием ЩЖ, и в частности, внутриклеточными структурами фолликулярного эпителия (лизосомы) [Weetman A.P., Ajjan R.A., 2002]. Уровень экспрессии варьировался от минимально выраженного до диффузного и яркого свечения, что позволило применить балльную

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

При всех изучаемых вариантах АИТП и при неиммунных вариантах тиреопатий (коллоидный зоб) иммуногистохимически фиксировалась экспрессия рецептора к IL-2 (CD25+) фолликулярным эпителием, в коллоиде и клетками лимфоплазмочитарной инфильтрации и мигрирующими в паренхиму ЩЖ макрофагами (рис. 37). Выраженность экспрессии рецептора к IL-2 коррелировала с выраженностью пролиферативных процессов в ЩЖ, независимо от нозологического варианта ( $r=0,7$ ,  $p=0,02$ ).

Анализ экспрессии CD25+ в подгруппах пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами не выявил значимых его различий, кроме пациентов с БГ и наличием онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия ЩЖ, где экспрессия CD25+ была самая слабая относительно как пациентов с коллоидным зобом, АИТ и другими вариантами БГ. На фоне фолликулярного эпителия видна массивная лимфоплазмочитарная инфильтрация, которая также минимально экспрессировала рецепторы к CD25+ (рис. 37, В).



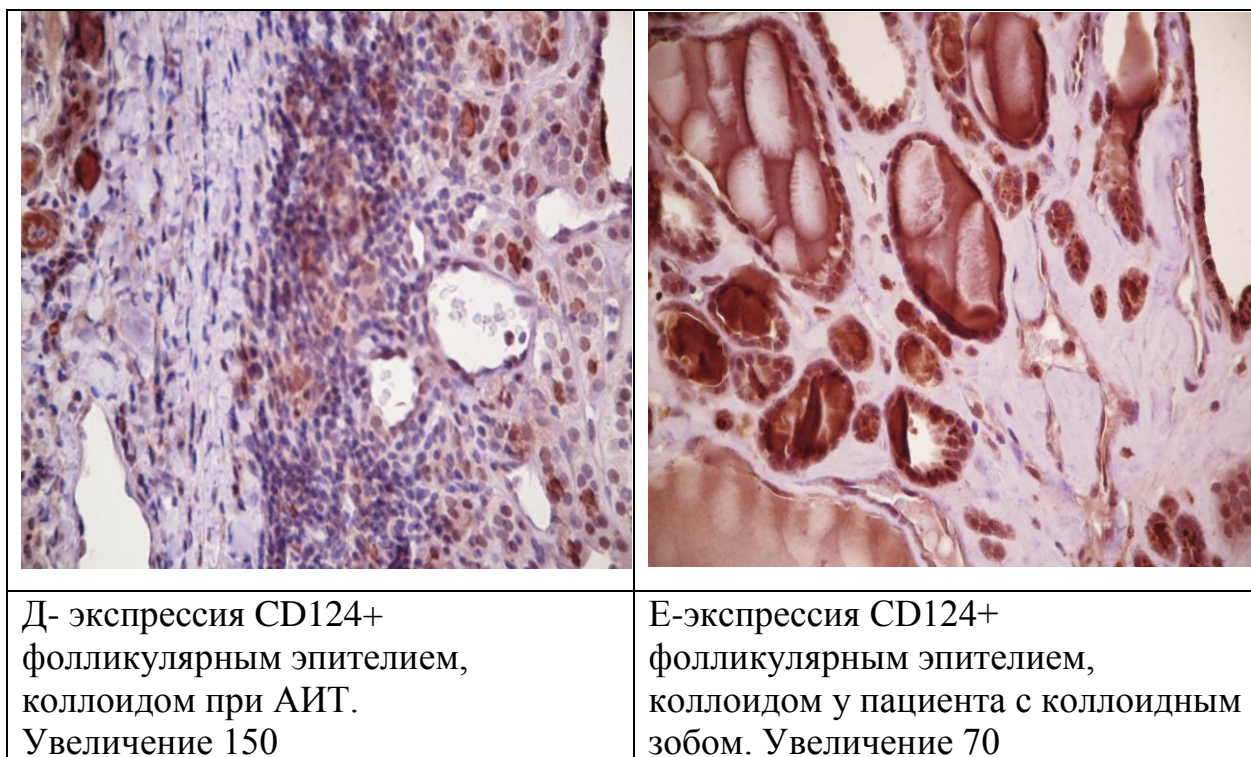
	
<p>А-экспрессия фолликулярным коллоидом при гистологический Увеличение 70</p>	<p>CD25+ эпителием, БГ (1 вариант). Увеличение 70</p>
	
<p>В-экспрессия фолликулярным коллоидом при гистологический онкоцитарной фолликулярного Увеличение 150</p>	<p>CD25+ эпителием, БГ (3 вариант с перестройкой эпителия). Увеличение 150</p>
	
<p>Д-экспрессия CD25+ фолликулярным эпителием, коллоидом у пациента с коллоидным зобом. Увеличение 70.</p>	

**Рис. 37.** Варианты экспрессии CD25+ в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г) и коллоидном пролиферирующем зобе (Д).



Интересно отметить, что при АИТ в фазе гипотиреоза экспрессия CD25+ инфильтрирующими ткань ЩЖ лейкоцитами превышала таковую фолликулярным эпителием и минимально накапливалась в коллоиде, что может отражать степень функциональной активности ЩЖ.

<p>А-экспрессия фолликулярным коллоидом при гистологический Увеличение 70</p>	<p>Б-экспрессия фолликулярным коллоидом при гистологический Увеличение 150</p>
<p>В-экспрессия фолликулярным коллоидом при гистологический онкоцитарной фолликулярного Увеличение 150</p>	<p>Г-экспрессия фолликулярным коллоидом при АИТ. Увеличение 70</p>



**Рис. 38.** Варианты экспрессии CD124+ в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г, Д) и коллоидном пролиферирующем зобе (Е).

Интересные данные получены нами при оценке экспрессии CD124+ в ткани ЩЖ при АИТП. Экспрессия CD124+ фиксировалась на фолликулярном эпителии ЩЖ, ярче всего в коллоиде и лимфоплазмочитарными инфильтратами (рис. 38). Максимальная экспрессия CD124+ наблюдалась при 1-м и 2-м гистологических вариантах БГ (рис. 38, А и Б), минимальная при БГ с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия (3 вариант, рис. 38, В). В этих случаях и инфильтрирующие ткань железы лейкоциты экспрессировали рецептор к IL-4 слабо.

Экспрессия рецептора к IL-4 не является специфичной для конкретного варианта тиреопатий, так как фиксировалась во всех случаях, мало коррелировала с клиническими проявлениями заболевания, такими как объем ЩЖ, возраст, пол, склонность к узлообразованию, стаж заболевания и тд.

Корреляционный анализ выявил сильную обратную зависимость между выраженностью экспрессии CD124+ и содержанием в сыворотке пациентов с АИТП св.  $T_3$  ( $r = -0,75$ ,  $p = 0,01$ ), что косвенно указывает на взаимосвязь между выраженностью экспрессии рецептора к IL-4 и развитием дистиреоза. Аналогичной связи не получено относительно ТТГ и св.  $T_4$ . Известно, что св.  $T_3$  появляется из 2 источников – продукция непосредственно в ЩЖ, деструкция ткани с преобладанием  $T_3$  тиреотоксикоза над  $T_4$  и периферическая конверсия из  $T_4$ , которая является маркером йоддефицитного состояния. Поскольку коэффициент корреляции связывает характер окраски именно клетками фолликулярного эпителия, то видимо степень экспрессии зависит именно от интратиреоидной продукции  $T_3$ , а поскольку экспрессия CD124+ носила неспецифический характер и фиксировалась при всех вариантах АИТП и коллоидном зобе, то смеем предположить, что степень экспрессии рецептора к IL-4 имеет отношение к выраженности интратиреоидного дефицита йода.

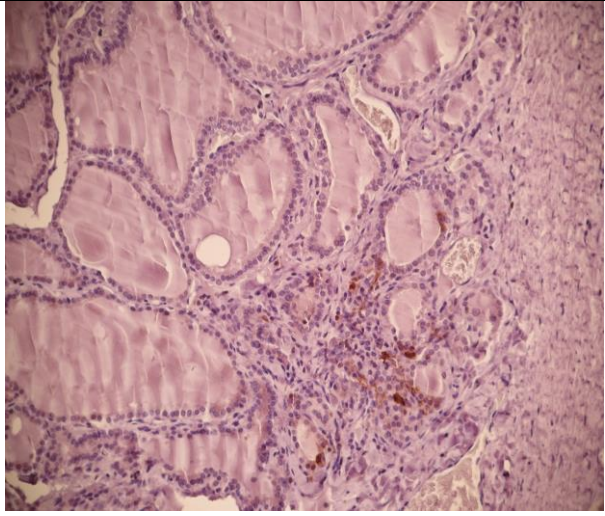
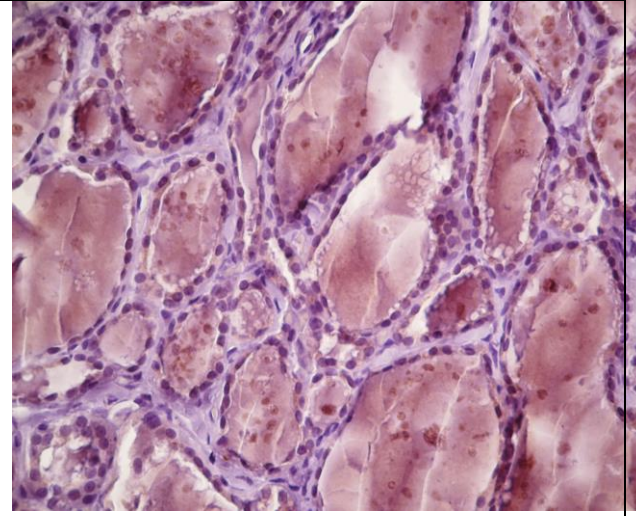
Также интересными представляются результаты, касающиеся характера экспрессии TNF-RI при АИТП. Было показано, что источником экспрессии рецептора к TNF- $\alpha$  являются только иммунциты, инфильтрирующие ткань ЩЖ. Кроме того, не все клетки, представляющие инфильтрат одинаково экспрессируют TNF-RI, вероятно это только клетки моноцитарно-макрофагального происхождения. Степень выраженности инфильтрации, экспрессирующей TNF-RI сильно варьировалась, как при БГ, так и при АИТ, не наблюдаясь при неиммунных тиреопатиях (коллоидный пролиферирующий зоб, рис. 39, Е). Нами зафиксировано сочетание максимальной экспрессии TNF-RI инфильтрирующими моноцитами/макрофагами при тиреопатиях с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия (рис. 39, В и Г).

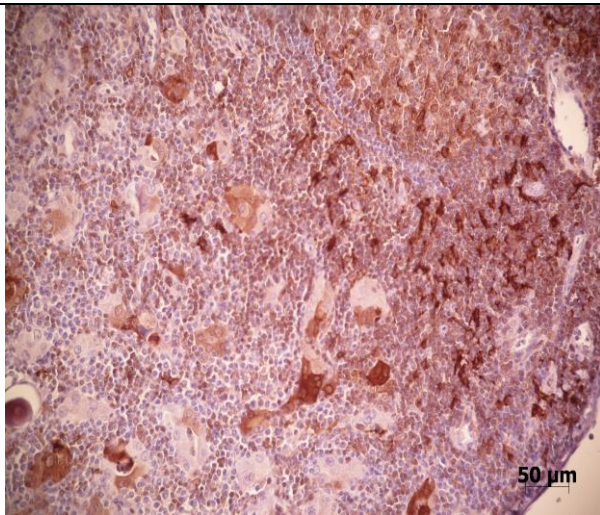
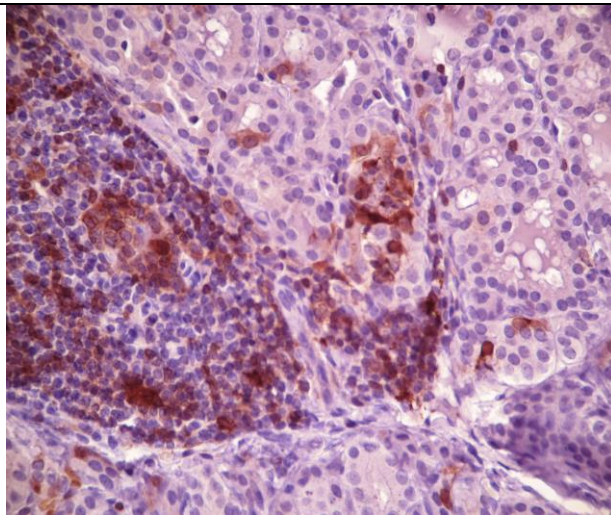
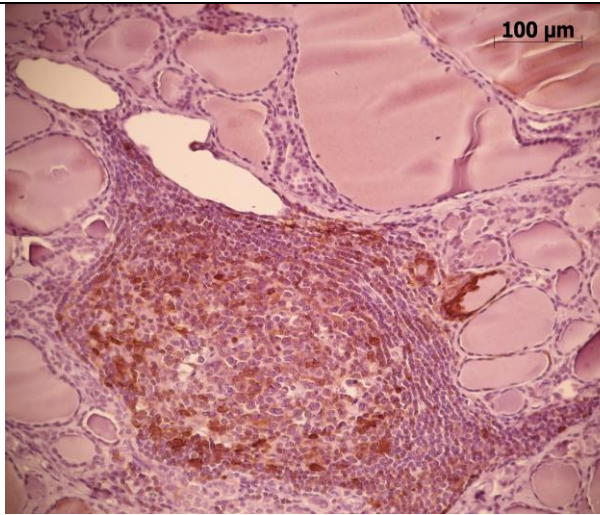
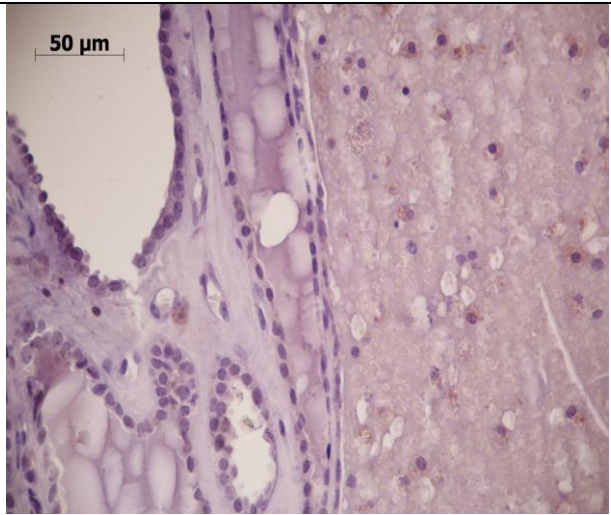
При анализе клинических и гормональных параметров были получены прямые корреляционные взаимосвязи между выраженностью



инфильтрации с гиперэкспрессией TNF-RI и возрастом пациентов с АИТП ( $r=0,5$ ,  $p=0,01$ ), а также с тенденцией к образованию «узлов» ( $r=0,6$ ,  $p=0,01$ ) и курением ( $r=0,5$ ,  $p=0,04$ ). Также получена обратная корреляционная связь выраженности инфильтрации ЩЖ с экспрессией TNF-RI и уровнем ТТГ ( $r= - 0,4$ ,  $p=0,03$ ), что связывает характер инфильтрата и изменение функционального состояния ЩЖ при АИТП.

Самым интересным на наш взгляд является выявленная ассоциация специфической инфильтрации с гиперэкспрессией TNF-RI с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия ЩЖ. Во-первых, в составе лейкоцитарных инфильтратов не все клетки экспрессировали TNF-RI. Клетки, экспрессирующие TNF-RI отличались крупным размером, имели крупное ядро, неровные контуры, что позволило причислить их к моноцитарно/макрофагальной системе. Во-вторых, во всех случаях, где зафиксированы моноциты/макрофаги, несущие TNF-RI происходила специфическая реакция и образование тиреоидных фолликулов с клетками Ашкенази-Гюртле, выраженность реакции варьировалась от единичных клеток до тотальной онкоцитарной трансформации тиреоидного эпителия (рис. 39 и 40).

	
<p>А- характер экспрессии TNF-RI при БГ (1 гистологический вариант). Увеличение 70</p>	<p>Б- характер экспрессии TNF-RI при БГ (2 гистологический вариант). Увеличение 150</p>

	
<p>В- характер экспрессии TNF-RI при БГ (3 гистологический вариант с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия). Увеличение 70</p>	<p>Г- макрофаги, экспрессирующие TNF-RI и фолликулы с онкоцитарной перестройкой у пациента с БГ. Увеличение 150</p>
	
<p>Д- лимфоидный фолликул, состоящий из клеток с выраженной экспрессией TNF-RI при АИТ. Увеличение 70</p>	<p>Е- практически полное отсутствие экспрессии TNF-RI у пациентки с коллоидным зобом и кистозной дегенерацией, единичные макрофаги внутри фолликула. Увеличение 150</p>

**Рис. 39.** Варианты экспрессии TNF-RI в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (А, Б, В, Г, Д) и коллоидном пролиферирующем зобе (Е).

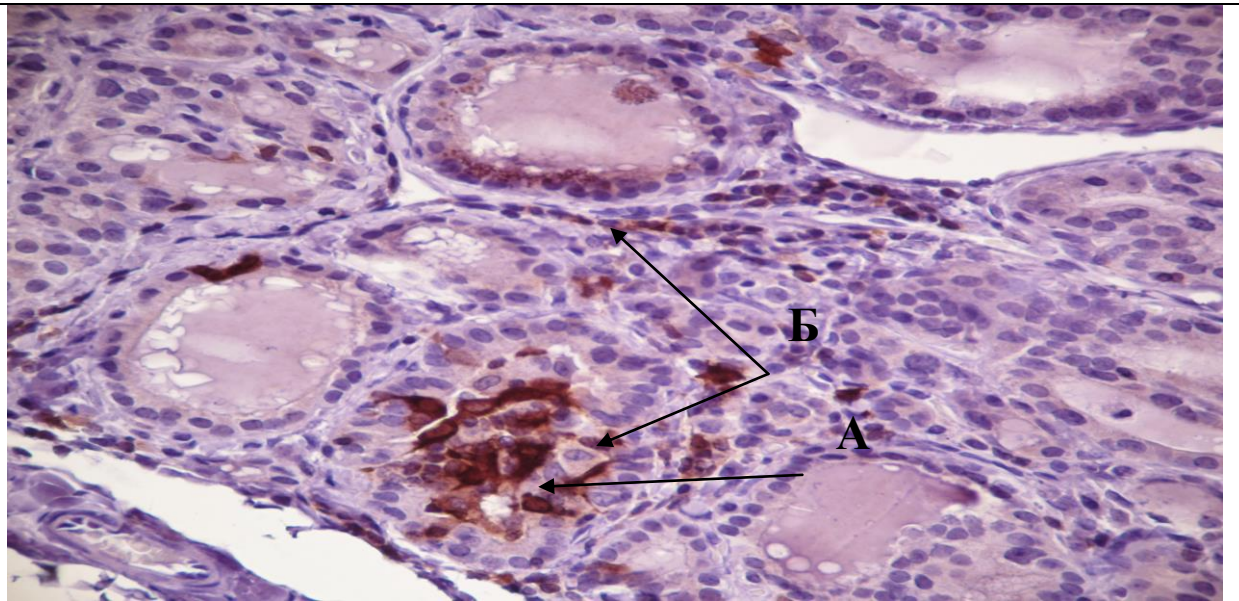
Также при анализе иммунологических параметров получены убедительные данные о взаимосвязи функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов пациентов с АИТП с имеющимися

морфологическими и иммуногистохимическими изменениями (рис. 41). Так, с 3-м гистологическим вариантом АИТП с онкоцитарной трансформацией тиреоидного эпителия была связана максимальная продукция мононуклеарными лейкоцитами TNF- $\alpha$  (базальная и ФГА-стимулированная), а также содержание в культуральной среде sTNF-RI и экспрессия TNF-RI на мембранах лимфоцитов и моноцитов крови.

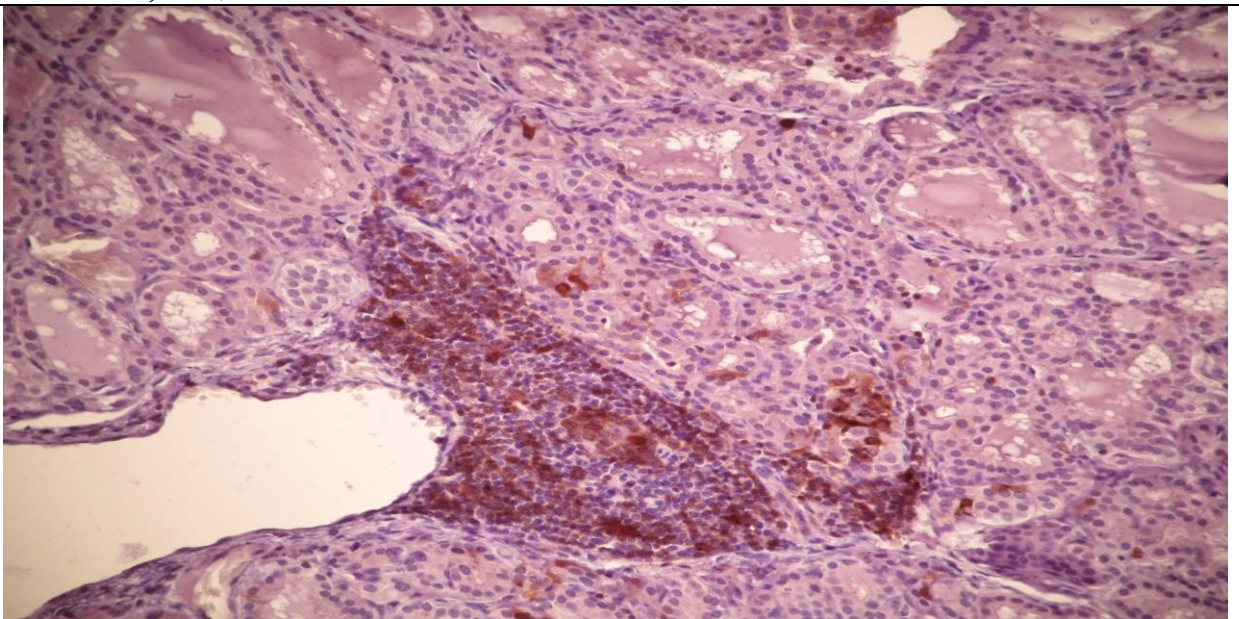
Спецификой аутоиммунного воспаления ЩЖ является то, что помимо моноцитов и антиген-специфичных Т-лимфоцитов крови, продуцировать TNF- $\alpha$  и презентировать комплементарные ему рецепторы способны фолликулярные клетки щитовидной железы (табл. 36). Однако, в нашем исследовании мы не получили, в отличие от экспрессии IL-2R и IL-4R, окрашивания фолликулярного эпителия при детекции TNF-RI. Экспрессировали данный рецептор только клетки моноцитарно/макрофагальной инфильтрации, также не получено экспрессии данного рецептора фолликулярным эпителием при коллоидном пролиферирующем зобе (группа сравнения). В некоторых участках фолликула визуализировалась экспрессия TNF-RI только при наличии «инвазии» фолликула моноцитом, экспрессирующим TNF-RI (рис. 42).

Известно, что при взаимодействии TNF- $\alpha$  с комплементарным ему мембранным рецептором первого типа запускаются сигнальные пути активации MAP-киназ и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, контролирующие реакции синтеза цитокинов, а также запуск программы апоптоза клетки.



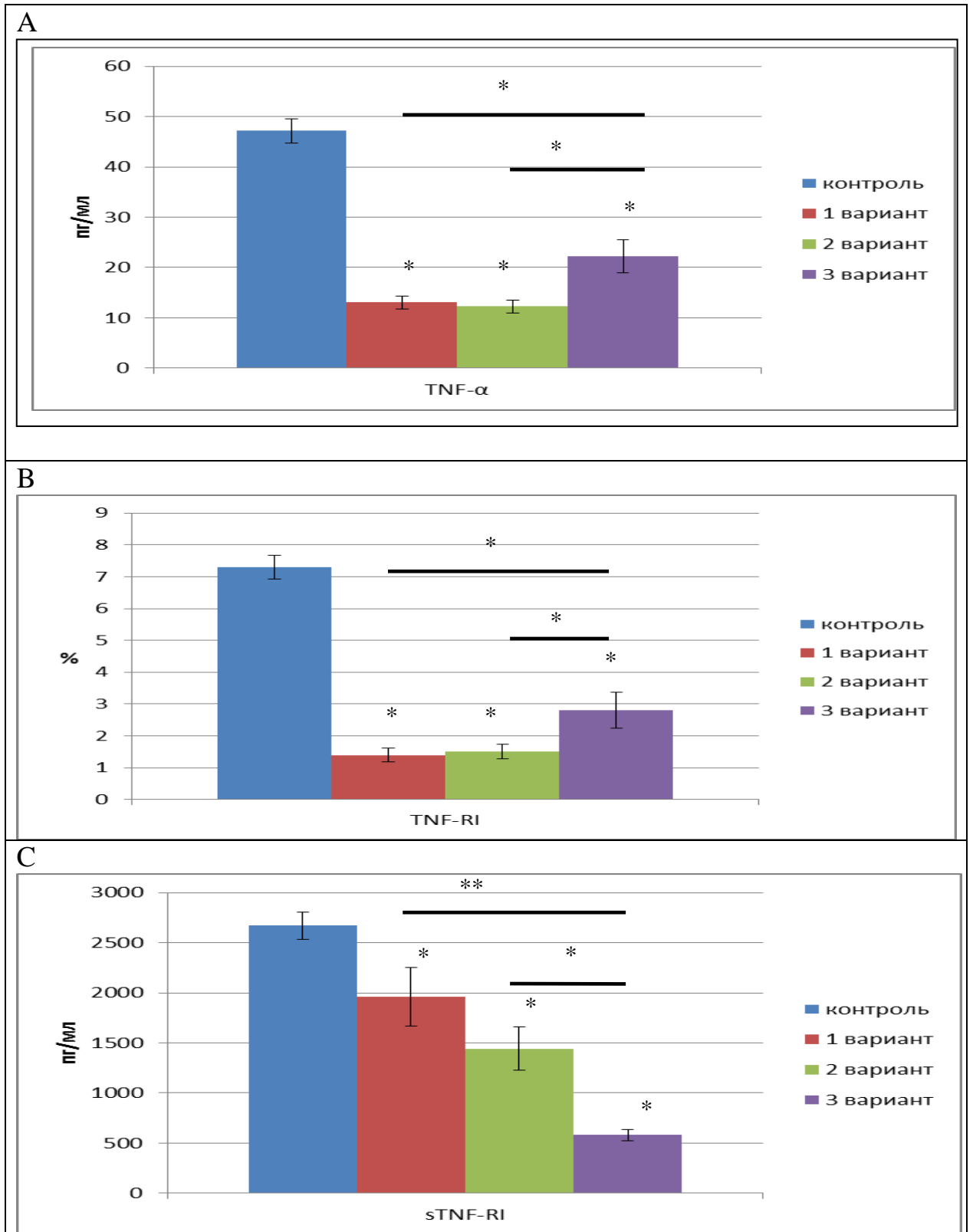


А-макрофагальная инфильтрация внутри фолликула, клетки экспрессируют TNF-RI; Б- участки онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия, пациент с БГ. Увеличение 400



Онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия вблизи массивной моноцитарно-макрофагальной инфильтрации ЩЖ при БГ. Увеличение 150

**Рис. 40.** Взаимосвязь экспрессии TNF-RI на инфильтрирующих паренхиму ЩЖ мононуклеарных лейкоцитах и онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия ЩЖ при АИТП.

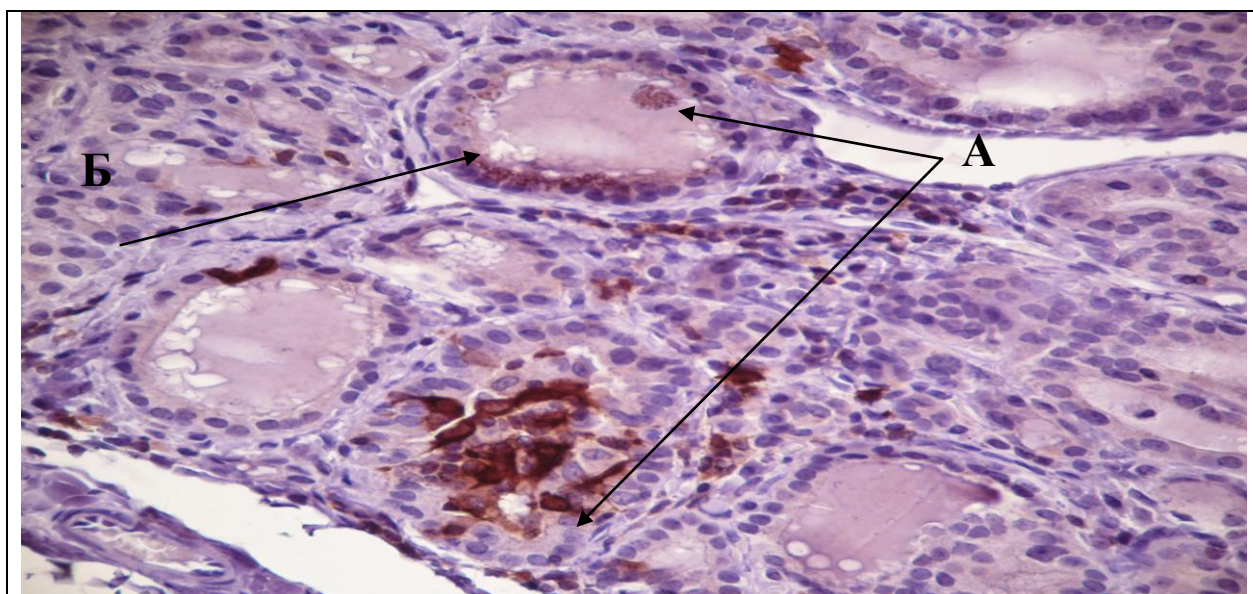


**Рис. 41.** Концентрация TNF-α (A) и sTNF-RI (C) в супернатантах культуральных сред мононуклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов, несущих TNF-RI (B) у пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами (1-3) перестройки паренхимы ЩЖ (медиана, доверительный интервал) относительно контрольной группы.

**Примечание:** \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля, сравнения; \*\* -  $p < 0,01$  в сравнении с группами сравнения.



В таком случае отсутствие выраженной экспрессии TNF-RI клетками фолликулярного эпителия ЩЖ свидетельствует о их низкой предуготованности к TNF-зависимому апоптозу. В работе M. LaBue et al. (2004) показано, что одним из механизмов, ограничивающим цитотоксическое воздействие TNF- $\alpha$  на клетки ЩЖ, может быть повышенная продукция тиреоцитами sTNF-RI – блокатора действия цитокина, путем альтернативного сплайсинга через активацию протеинкиназы C.



**Рис. 42.** Миграция моноцита, экспрессирующего TNF-RI внутрь фолликула (А) и слабое окрашивание TNF-RI в клетках фолликулярного эпителия. Увеличение 400.

Интерлейкины играют ведущую роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы. Цитокининдуцированный апоптоз является достаточно сложным механизмом и реализуется через специфические рецепторы суперсемейства TNF-б, а именно Fas (CD95, APO-1), рецептор типа 1 к TNF- $\alpha$  (TNF-R1), DR3 (WSI-1), DR4 (TRAIL-R1) и др. [Казначеев К. С., 1999; Симбирцев А. С., 2002]. Рецепторы TNF могут опосредовать как про-, так и антиапоптотический механизмы взаимодействия, что обусловлено активацией тех или иных молекул, опосредующих каскад гибели клетки [Потапнев М.П., 2002]. Так, апоптотический эффект TNF- $\alpha$ , реализующийся через TNF-R1, связан с активацией прокаспазы 8, либо прокаспазы 2, а для

индукции антиапоптотического действия наиболее важным считается активация эффекторных молекул, связанных с транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B (nuclear factor – kappa B) (TRAF1, TRAF2, GM-CSF и т.д.).

В главе 4 нами отражен факт угнетения продукции моноклеарными лейкоцитами TNF- $\alpha$  (при аутоиммунных тиреопатиях) в условиях *in vitro* при отсутствии стимулирующих сигналов и при добавлении митогена, а также снижение показателей рецепции цитокина (см. табл. 34,35). Нами высказано предположение, что циркулирующие в крови иммуноциты находятся в состоянии сниженной функциональной активности, в то время как активно функционирующие клетки локализованы в очаге воспаления. Данное предположение получило подтверждение результатами иммуногистохимического исследования, в котором убедительно зафиксирован факт участия активированных моноклеарных лейкоцитов, экспрессирующих TNF-RI в иммунопатогенезе АИТП (рис. 40,42).

Интересны причины, приводящие к формированию клеточного фенотипа интратиреоидной инфильтрации. Причинами к изменению лимфоплазмочитарной инфильтрации на инфильтраты с преобладанием моноцитов/макрофагов могут быть различия на фазе индукции аутоиммунного воспаления. Так, тиреоциты в ответ на иммунную атаку и воздействие цитокинов оказываются способными экспрессировать многие иммунологически активные молекулы, в том числе факторы адгезии и интерлейкины (ICAM-1, IL-6, IL-8) [Fang, Y., 2008; Дрометр, Д. А. , 2009; M. Nakahara, Y. Nagayama, O. Saito et al., 2009]. IFN- $\gamma$  активирует макрофаги и NK-клетки, а также является кофактором индукции дифференцировки CD4<sup>+</sup>лимфоцитов в Т-хелперы 1-го типа, которые, в свою очередь, также активируют макрофаги. Активированные макрофаги участвуют в процессе фагоцитоза и презентации антигенов, интенсивно продуцируют цитокины и факторы роста. Все это определяет развитие очага реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Также Т-хелперы 1-го типа, выделяя цитокины и сигнальные молекулы, в комплексе с антигенпрезентирующими клетками (CD8+-лимфоциты, макрофаги, NK-клетки) инициируют антиген-специфическую стимуляцию В-лимфоцитов, в результате чего начинается продукция специфических иммуноглобулинов (класса G) против различных компонентов тиреоцитов (ТГ и ТПО). Показано, что субклассы АТ-ТПО (IgG1, IgG2 и IgG3) способны активировать каскад комплемента. При этом есть данные о том, что степень этой активации коррелирует с выраженностью нарушения функции ЩЖ и ультразвуковых изменений [Сарра, М., 2011]. Таким образом, тиреотоксическая фаза АИТ является результатом, как прямого воздействия цитотоксических клеток, так и сублетальной антителозависимой атаки комплемента на тиреоциты, следствием чего является высвобождение готовых тиреоидных гормонов в кровеносное русло [Weetman, A.P., 2004; Swain, M., 2005].

Таким образом, необходимо поднять вопрос о гетерогенности синдрома гипертиреоза. Этиологическая структура синдрома гипертиреоза представлена следующими основными нозологическими формами: аутоиммунные тиреопатии (болезнь Грейвса–Базедова (БГ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ), в котором выделяют безболевого, послеродовой и цитокин-индуцированный варианты); функциональная автономия (ФА) и подострый тиреоидит. Многообразие этиологических вариантов синдрома гипертиреоза, схожих как по клиническим, так и по лабораторным проявлениям, что зачастую затрудняет проведение дифференциальной диагностики с помощью доступных в клинической практике рутинных методов и диктует необходимость поиска специфических иммунологических маркеров, отражающих патогенетическую суть заболеваний. Также необходимо вспомнить, что тиреотоксикоз и гипертиреоз – отнюдь не синонимы. Гипертиреоз – это всего лишь одна из причин тиреотоксикоза, пусть и самая частая. При

гипертиреозе щитовидная железа находится в состоянии гиперфункции, а при других видах тиреотоксикоза (например, при введении тиреоидных гормонов извне или их секреции тератомой яичника) – в состоянии гипофункции, или блокады. При БГ наблюдается именно состояние гиперфункции ЩЖ за счет функциональной активности аутоантител (АТ-рТТГ), а при АИТ - синдром гипертиреоза связан с деструкцией тиреоидных фолликулов и «утечкой» готовых запасов тиреоидных гормонов в кровь. Как уже было отражено результатами нашего исследования четкое разделение аутоиммунных процессов на БГ и АИТ зачастую затруднено, клиницисты опираются на дефиниции, которые основаны на инструментальных и серологических методах исследования, измененном гормональном профиле, по которому четко можно выделить АИТ только после развития первичного манифестного гипотиреоза, хотя о тиреотоксической фазе АИТ упоминается во всех учебниках, но она не имеет четко очерченных диагностических критериев.

В группе пациентов с БГ, куда были отнесены все пациенты с синдромом гипертиреоза, имеющие специфические сонографические признаки БГ, положительный титр антитиреоидных ауто-антител (специфическими для БГ считалось наличие АТ-рТТГ), наличие эндокринной офтальмопатии, по результатам морфологического и иммуногистохимического исследований, не было выделено четких морфологических критериев, свойственных только БГ. Мало того, анализируя клинико-морфологические параллели, можно заключить следующее – имеет место гетерогенность системных и локальных иммунологических реакций, определяющих клинические проявления АИТП.

Исходя из полученных результатов можно выделить 2 клинико-иммунологических и морфологических кластера синдрома гипертиреоза: **первый** включает формирование 1 и 2 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), **и второй** – представлен 3-м гистологическим вариантом с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия, выраженной моноцитарно/макрофагальной инфильтрацией с экспрессией TNF-RI и клиническими паттернами, включающими: более старшая возрастная группа пациентов, меньшие размеры зоба, появление «псевдоузлов» при ультразвуковом исследовании, отражающие наличие лимфоидных фолликулов-инфильтратов, более мягкое течение тиреотоксикоза, процент пациентов с ЭОП был одинаков в обоих кластерах. Скорее всего, 2-й кластер представляет собой сочетание классической БГ с АИТ, тем не менее, набор клинических и лабораторно-инструментальных признаков приводил к тому, что такие пациенты относились к группе больных БГ.

Таким образом, на сегодняшний день не существует строго специфических признаков БГ и АИТ. Предстоит огромная задача разработки специфических методов управления аутоиммунными процессами на уровне органа-мишени, выявленные клинικο-иммунологические-морфологические параллели при АИТП способствуют выбору направления дальнейших исследований.

## **ГЛАВА 5. Общие закономерности и особенности цитокинопосредованных механизмов дисрегуляции иммунной системы при эндокринопатиях с различной локализацией аутоиммунного процесса (методы многомерного анализа)**

### **5.1. Комплексное сравнение иммунологических параметров у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом и аутоиммунными тиреопатиями**

Для выявления комплекса наиболее информативных показателей, вовлеченных в патогенез аутоиммунного повреждения щитовидной и поджелудочной железы, был проведен дискриминантный анализ данных – субпопуляционный состав лимфоцитов крови обследованных пациентов, концентрация цитокинов IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов крови и количество лимфоцитов, несущих рецепторы к указанным цитокинам. Показатели содержания в сыворотке крови специфических аутоантител намеренно не учитывались в дискриминантном анализе, поскольку эти данные использовались при клиническом обследовании для постановки диагноза и последующей классификации пациентов по нозологическим группам.

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

В случае определения в качестве группирующего признака аутоиммунного сахарного диабета в соответствии с заданными критериями включения (F-критерий  $>3,84$ ) и исключения (F-критерий  $<2,71$ ), учитывая также значения толерантности, лямбда Уилкса и уровня значимости ( $p$ ),

после третьего шага добавления новых переменных в модель не вносило существенных изменений в ее характеристики, поэтому процедура была остановлена. Таким образом, в модель СД вошли показатели концентрации IL-2, TNF- $\alpha$  и процент CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 38).

Оценка итоговой модели на способность различать группы здоровых лиц и больных аутоиммунным СД показала, что значение  $\chi^2$  составляет 65,131, при этом уровень статистической значимости (p) имел значение менее 0,001, что указывает на состоятельность данной модели.

Таблица 38

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

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

Для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции, с учетом влияния остальных переменных, входящих в модель, были рассчитаны нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции (табл. 39).

Таблица 39

Нормированные коэффициенты канонической  
дискриминантной функции  
(группирующий признак – диабет)

Показатель	Коэффициент
IL-2	1,027
TNF- $\alpha$	-0,411
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты	0,355

Учитывая абсолютные значения коэффициентов показано, что наибольший вклад в значение дискриминантной функции, разделяющей группы здоровых лиц и больных СД, вносит показатель концентрации IL-2 в супернатантах культуральных сред мононуклеарных лейкоцитов. Коэффициенты, соответствующие концентрации в культуральной среде TNF- $\alpha$  и количеству Th-лимфоцитов в крови оказались близки друг к другу по абсолютному значению (табл. 39).

Таким образом, было получено каноническое дискриминантное уравнение:

КЛДФ (каноническая линейная дискриминантная функция) =  $-3,233 + 0,025 * IL-2 - 0,003 * TNF-\alpha + 0,052 * CD4^+$ -клетки.

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

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

Аналогично расчетам с пошаговым включением переменных, проведенным для решения задачи 1, при использовании в качестве группирующего признака аутоиммунные тиреопатии в дискриминантное уравнение вошли значения таких переменных как: количество NK-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, субпопуляций лимфоцитов CD4 и CD8, В-клеток, а также продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$ .

Оценка итоговой модели на способность разделять здоровых лиц и пациентов с аутоиммунными тиреопатиями показала, что значение  $\chi^2$



составляет 17,877, при этом уровень статистической значимости (p) был равен 0,022, что указывает на состоятельность данной модели.

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции для каждой переменной представлены в табл. 40.

Полученные результаты показывают, что максимальный вклад в значение дискриминантной функции вносят параметры содержания в крови НК-лимфоцитов, Т-лимфоцитов и концентрации в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов TNF- $\alpha$ . Близкими по абсолютному значению нормированных коэффициентов оказались концентрация IL-2, IL-4 и количество В-лимфоцитов (-0,322, -0,270 и -0,239, соответственно) (табл. 40).

Таблица 40

Нормированные коэффициенты канонической  
дискриминантной функции  
(группирующий признак – тиреопатии)

Показатель	Коэффициент
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>low</sup> -лимфоциты	1,193
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты	0,547
TNF- $\alpha$	0,509
IL-2	-0,322
IL-4	-0,270
CD19 <sup>+</sup> -лимфоциты	-0,239
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты	0,148
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты	-0,029

Минимальным в значение дискриминантного уравнения оказался вклад количества в крови субпопуляций CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 40).

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

$$\text{КЛДФ (d)} = -8,687 + 0,211 * \text{НК-лимфоциты} + 0,08 * \text{CD3}^+ + 0,004 * \text{TNF-}\alpha - 0,006 * \text{IL-2} - 0,012 * \text{IL-4} - 0,061 * \text{CD19}^+ + 0,024 * \text{CD8}^+ - 0,004 * \text{CD4}^+.$$

В полученной модели заболевания значение центроидов для группы больных тиреопатиями составило -0,618 и 0,425 – для группы здоровых лиц. Результаты классификации здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными тиреопатиями, полученные в данной модели, показали, что относительная частота принятия безошибочных решений, как по отношению к истинно больным, так и истинно здоровым составляет 70,3%, чувствительность – 73% и специфичность – 67%.

Таким образом, установлено, что продукция IL-2, TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови и количество циркулирующих CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов составляют комплекс иммунологических показателей, которые значимо влияют на развитие аутоиммунного воспаления в органах-мишенях, как в поджелудочной, так и в щитовидной железе. В тоже время показано, что вклад дисбаланса цитокинпродуцирующей активности МНЛ (продукция IL-2) и содержания Th-лимфоцитов в развитие аутоиммунного сахарного диабета более значителен, чем при аутоиммунных тиреопатиях, где на первое место выступают такие параметры клеточного иммунитета, как содержание циркулирующих клеток натуральных киллеров и общее количество Т-лимфоцитов. В целом анализ данных, включенных в обучающую выборку, указывает на наличие при аутоиммунных тиреопатиях более широкого набора ключевых показателей (число степеней свободы в модели заболевания – 8), вовлеченных в патогенез заболевания, чем при сахарном диабете (число степеней свободы в модели заболевания – 3). Независимо от этого, продукция цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови (IL-2 и TNF- $\alpha$  при аутоиммунном СД, а также IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$  при аутоиммунных тиреопатиях) находилась в числе наиболее информативных факторов, связанных с аутоиммунным повреждением поджелудочной и щитовидной железы.

## **5.2. Комплексное сравнение иммунологических параметров у пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом с манифестным течением и медленно прогрессирующего сахарного диабета взрослых (LADA)**

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

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

Таким образом, была построена многопараметрическая модель на основании наиболее известных клинических и метаболических признаков

аутоиммунного сахарного диабета – возраст пациентов, возраст дебюта заболевания, метаболические параметры (ИМТ, ОТ, секретины С-пептида тощаковая и стимулированная).

Лучшей классификационной моделью была выбрана включающая в себя несколько клинических признаков – возраст пациента, возраст дебюта сахарного диабета и окружность талии, но не ИМТ (табл. 41).

Таблица 41

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

Показатель	коэффициент
	1
возраст дебюта СД, лет	0,981
возраст пациента лет	-0,285
Окружность талии (ОТ), см	0,611

В табл. 41 указаны нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции. Эти коэффициенты служат для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции, с учетом влияния остальных переменных. Чем больше абсолютное значение коэффициента, тем больше относительный вклад данной переменной в значение дискриминантной функции, разделяющей классы. Таким образом, наиболее значимым для значения дискриминантной функции разделения двух клинических вариантов аутоиммунного сахарного диабета (LADA и СД 1 тип манифестный) явился возраст, в котором отмечался дебют сахарного диабета и окружность талии, что отражает выраженность абдоминального ожирения.

Качество модели оценивалось по величине Лямбда Уилкса (табл. 42), модель оценена как качественная и достоверная ( $p < 0,05$ ).

Таблица 42

Качество многопараметрической модели для разделения двух вариантов сахарного диабета (LADA и СД 1 типа с манифестным течением)

функция	Лямбда Уилкса	$\chi^2$	df	p
1	0,616	63,785	3	0,000

Таким образом, чувствительность данной дискриминантной модели, основанной только на клинических параметрах, составила 77,4%, специфичность— 86,5%, безошибочность классификации – 81,9% ( $p < 0,05$ , табл. 43).

Таблица 43

Результаты классификации дискриминантной функции

	n	тип диабета	предсказанный тип СД		всего
			СД1 манифестный	LADA	
Наблюдаемый тип СД	абс.	СД1 манифестный	32	5	37
		LADA	7	24	31
	%	СД1 манифестный	86,5	13,5	100,0
		LADA	22,6	77,4	100,0

Примечание: 81,9% случаев обучающей выборки были правильно классифицированы

Тем не менее, целью многомерного анализа явилось выявление не только уже известных клинических, метаболических маркеров аутоиммунного сахарного диабета, но и из большого массива иммунологических данных определить наиболее значимые для дальнейшего изучения, ассоциированные иммунологические маркеры, а также использования в качестве дополнительного лабораторного метода диагностики латентного аутоиммунного сахарного диабета. С этой целью, в уже имеющуюся информативную модель с клиническими параметрами, для построения дискриминантной функции включались показатели

иммунологического блока исследований: количество лимфоцитов различных субпопуляций, базальная и стимулированная продукция цитокинов *in vitro*, экспрессия комплементарных изучаемым цитокинам рецепторов лимфоцитами крови. Добавление иммунологических параметров в подавляющем большинстве случаев приводило к ухудшению качества дискриминантной функции. Из всего массива иммунологических данных только включение в модель концентрации IL-10 в супернатанте нестимулированной культуры моноклеарных лейкоцитов качественно улучшило модель дискриминации субвариантов аутоиммунного сахарного диабета с достигнутым уровнем правильно классифицируемых объектов 100,0% (табл. 40-42).

Таким образом, в информативную дискриминантную модель были включены 4 параметра: возраст пациента на момент дебюта СД, возраст пациента на момент обследования, окружность талии и концентрация IL-10 в супернатанте культуральных сред нестимулированных моноклеарных лейкоцитов (табл. 44).

Таблица 44

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

	функция
	1
Возраст пациента, лет	0,692
Окружность талии (ОТ), см	4,479
возраст дебюта СД, лет	-1,504
Концентрация IL-10 баз., пг/мл	5,531

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции служат для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции, с учетом влияния остальных переменных. Чем больше абсолютное значение коэффициента,

тем больше относительный вклад данной переменной в значение дискриминантной функции, разделяющей классы (табл. 44).

Чем больше значение  $\chi^2$ -квадрат, тем сильнее дискриминантная функция различает группы и лучше соответствует своему назначению.  $p=0,02$  – уровень статистической значимости для получившейся модели (табл.45). Структурная матрица содержит корреляции между дискриминантной функцией и каждой из переменных. Переменные упорядочены по абсолютной величине корреляций (табл. 46).

Таблица 45

Оценка состоятельности итоговой модели дискриминации аутоиммунного сахарного диабета и сахарного диабета 2 типа

функция	Лямбда Уилкса	$\chi^2$	df	p
1	0,026	10,993	4	0,02

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

КЛДФ (d) = - 38,06 + 0,466 \* ОТ (см) + 0,081 \* возраст пациента (лет) + (- 0,179)\* возраст дебюта СД (лет) + 0,004\* IL-10 баз. концентрация (табл. 47).

Таблица 46

Структурная матрица корреляции дискриминантной функции и отдельных переменных, включенных в модель

Показатель	функция
	1
возраст дебюта СД, лет	-0,216
Возраст пациента, лет	-0,134
IL-10 баз. концентрация пг/мл	0,088
Окружность талии (ОТ), см	0,063

Таблица 47

## Коэффициенты канонической дискриминантной функции

	функция
	1
Окружность талии (ОТ), см	0,466
возраст, лет	0,081
возраст дебюта СД, лет	-0,179
IL-10 баз. концентрация, пг/мл	0,004
Константа	-38,06

Центроид представляет собой значение функции, получаемое при подстановке в дискриминантное уравнение средних значений предикторов в группе. В полученной модели заболевания значение центроидов для группы больных LADA составило -6,018 и 4,513 – для группы СД 1 типа манифестного течения.

Таблица 48

## Координаты центроидов групп

тип сахарного диабета	функция
	1
СД 1 манифестный	4,513
LADA	-6,018

Для каждого нового объекта рассчитывается значение КЛДФ и определяется соответствующая точка на координатной прямой. Объект считается принадлежащим к тому классу, чей центроид ближе.

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

Безошибочность - это относительная частота принятия безошибочных решений, как по отношению к пациентам с LADA, так и пациентам с СД1 манифестного течения - 96,0%.

Ложноотрицательный ответ (ошибка первого рода) - это относительная частота отнесения истинно больного (LADA) к классу здоровых (СД1) - 0,0%.



Ложноположительный ответ (ошибка второго рода) - это относительная частота отнесения истинно здорового (СД1) к классу больных (LADA) – 0,0%.

Таблица 49

Результаты классификации, рассчитанные по обучающей выборке

		тип сахарного диабета	прогнозируемый диагноз		всего
			СД1	LADA	
наблюдаемый тип СД	n	СД1	37	0	37
		LADA	0	31	31
	%	СД1	100,0	0,0	100,0
		LADA	0,0	100,0	100,0

Таким образом, была получена качественное уравнение дискриминации двух субвариантов аутоиммунного сахарного диабета только с набором уже известных клинических признаков, таких как возраст пациента и возраст, в котором СД манифестировал, окружности талии и только одного иммунологического параметра – концентрации IL-10 в супернатантах нестимулированных мононуклеарных лейкоцитов.

### 5.3. Комплексное сравнение иммунологических параметров у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса)

Аналогичный подход (как и в отношении аутоиммунного сахарного диабета) к обработке массива клинических, гормональных и иммунологических данных использовался для выделения наиболее важных с точки зрения дальнейшего изучения и использования в качестве молекулярных маркеров аутоиммунного тиреоидита и болезни Грейвса. Использовался дискримантный анализ, поскольку включаемые в модель признаки - количественные.

Показатели гормонального профиля, профиль и уровень продукции аутоантител, преднамеренно не включался в анализ, так как эти данные применялись для верификации диагноза (построение обучающей выборки).

Лучшей по количеству правильно классифицированных объектов из предложенных иммунологических маркеров была модель, в которой наиболее значимыми оказались – количество NK-клеток ( $CD15+CD56^{low}$ ), концентрация IL-2 и TNF- $\alpha$  в культуральной среде нестимулированных мононуклеарных лейкоцитов.

Таблица 50

Оценка состоятельности итоговой модели

функция	Лямбда Уилкса	$\chi^2$	df	p
1	0,723	9,558	3	0,023

Таблица 51

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции  
(группирующий признак – вариант тиреопатии – АИТ и БГ)

	функция
	1
CD16+ CD56+	0,227
TNF- $\alpha$ , баз. концентрация, пг/мл	0,759
IL-2, баз. концентрация, пг/мл	0,415

Количество правильно классифицируемых объектов составило 78,8%, модель признана статистически значимой ( $p < 0,05$ ). Чувствительность предлагаемой модели отнесения пациента к группе АИТ или БГ путем определения трех иммунологических показателей ( $CD16^+ CD56^{+low}$ -клеток, концентрации  $TNF-\alpha$  и  $IL-2$  в нестимулированной культуре мононуклеарных лейкоцитов) составила 100%, специфичность модели - 63,2%, ложноположительных результатов – 36,8% (часть пациентов с АИТ будут отнесены к группе пациентов с БГ), ложноотрицательных – 0% (все пациенты с болезнью Грейвса будут правильно отнесены к группе пациентов с БГ) (табл. 50-54).

Таблица 52

## Коэффициенты канонической дискриминантной функции

	функция
	1
$CD16^+ CD56^{+low}$	0,037
$TNF-\alpha$ баз. концентрация, пг/мл	0,007
$IL-2$ баз. концентрация, пг/мл	0,008
константа	-1,419

Таблица 53

## Координаты центроидов групп

группа - тиреопатии	функция
	1
БГ	-0,698
АИТ	0,515

Таблица 54

## Результаты классификации, рассчитанные по обучающей выборке

		группа тиреопатии	прогнозируемый диагноз		всего
			БГ	АИТ	
обучающая выборка	абс.	БГ	45	0	45
		АИТ	11	18	29
	%	БГ	100,0	0,0	100,0
		АИТ	36,8	63,2	100,0

#### **5.4. Анализ иммунологических параметров, ассоциированных с функциональным состоянием щитовидной железы (гипотироз, тиротоксикоз) у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса)**

Необходимо понимать, что рассматривать патогенез аутоиммунных тиреопатий невозможно без учета влияния тиреоидного статуса (гипо/тиреотоксикоз) на функциональные свойства иммунокомпетентных клеток.

К настоящему времени накоплено достаточно фактов о влиянии тиреоидных гормонов на иммунную систему. Это действие опосредовано экспрессией ядерных рецепторов к трийодтирону ( $T_3R\alpha1$  и  $T_3R\alpha2$ ). Было показано, что у knock-out мышей по гену  $T_3R\alpha1$  и  $T_3R\alpha2$  значительно снижено количество иммунокомпетентных клеток (ИКК) в селезенке, причем больше страдает количество В-лимфоцитов. Также значительно снижено оказалось количество спленальных моноцитов и гранулоцитов. У мышей с дефектом рецепции трийодтиронина выявлен дефект пролиферации предшественников В-лимфоцитов [Arpin C., Pihlgren M., Fraichard A. et al. , 2000; Jiskra J., Antořová M., Límanová Z. et al., 2009].

Кроме экспериментальных работ, было проведено несколько клинических исследований, в которых проводилась оценка параметров клеточного иммунитета при различном функциональном состоянии щитовидной железы. Так, при супрессивной терапии L-тироксинотерапией и вызываемом им тиреотоксикозе увеличивались концентрации в сыворотке крови IL-18, sIL-2R и количества NK-клеток. После отмены тирокина и перехода в гипотиреоидное состояние указанные изменения параметров клеточного иммунитета возвращались к норме [Botella-Carretero J., Prados A., Manzano L. et al., 2005].

Рядом других исследований показано, что изменения ряда параметров клеточного иммунитета (sIL2R, MIG) ассоциировано больше с

функциональным состоянием щитовидной железы, нежели с активностью аутоиммунного процесса [Jiskra J., Antořová M., Límanová Z. et al., 2009].

Достижением иммунологии последних лет являются данные об экспрессии рецепторов к трийодтиронину на дендритных клетках (ДК) щитовидной железы и о влиянии тиреоидных гормонов на пролиферацию, дифференцировку и функции последних. Физиологические концентрации  $T_3$  вызывают экспрессию маркеров созревания дендритных клеток (МНС II класса, CD80, CD86, и CD40), значимо усиливают продукцию ими IL-12, а также стимулируют способность ДК вызывать пролиферацию и созреванию наивных Т-клеток, продукцию ими IFN $\gamma$  [Mascanfroni I., Montesinos M., Susperreguy S., Cervi et al., 2008].

Хорошо известно, что главным диагностическим критерием АИТ является развитие гипотиреоза. Однако, клиницисты часто сталкиваются с ситуацией, когда имеются клинические (зоб), иммунологические (АТ-ТПО, АТ-ТГ) и сонографические признаки АИТ, и даже цитологические маркеры АИТ, полученные при ТАБ (при узловых формах АИТ), но нет развития гипотиреоза. Тогда диагноз АИТ становится вероятностным, и особенно актуально изучение параметров иммунопатогенеза АИТП, связанных с исходом АИТ в гипотиреоз

Таким образом, является целесообразным поиск иммунологических маркеров, ассоциированных с исходом аутоиммунных тиреопатий (АИТ, БГ) – изменением функционального статуса щитовидной железы (гипотиреоз, тиреотоксикоз).

С этой целью проведен дискриминантный анализ комплекса иммунологических параметров (количество лимфоцитов различных субпопуляций, базальная и стимулированная продукция цитокинов *in vitro*, экспрессия комплементарных изучаемым цитокинам рецепторов лимфоцитами крови) с пошаговым отбором наиболее значимых для классификации (группирующий признак – гипотиреоз, тиреотоксикоз).

Характеристика полученной дискриминантной функции отражена в таб. 55-60.

При построении модели использовался алгоритм последовательного добавления переменных (метод пошагового добавления переменных, критерий минимального расстояния Махаланобиса). Были поставлены две классификационные (дискриминантные) задачи – построение канонической дискриминантной функции для выявления наиболее информативных признаков гипотиреоза/тиреотоксикоза (дистиреоза – задача 1) при АИТП, в сравнении с АИТ в эутиреоидном состоянии (задача 2).

В случае определения в качестве группирующего признака дистиреоза в соответствии с заданными критериями включения (F-критерий  $>3,84$ ) и исключения (F-критерий  $<2,71$ ), учитывая также значения толерантности, лямбда Уилкса и уровня значимости ( $p$ ), после третьего шага добавления новых переменных в модель не вносило существенных изменений в ее характеристики, поэтому процедура была остановлена. Таким образом, в модель, определяющую дистиреоидное состояние при АИТП, вошли показатели концентрации IL-4 и процент CD16<sup>+</sup>CD56<sup>low</sup>-лимфоцитов (табл. 55, 56).

Оценка итоговой модели на способность различать группы эутиреоидных лиц и больных АИТП в состоянии гипо/тиротоксикоза показала, что значение  $\chi^2$  составляет 24,035, при этом уровень статистической значимости ( $p$ ) имел значение менее 0,001, что указывает на состоятельность данной модели.

Пошаговое включение переменных в дискриминантное уравнение  
(группирующий признак – дистиреоз)

Шаг		толерантность	p	Min. F
0	IL-2 баз. конц., пг/мл	1,000	0,150	2,155
	IL-4 конц., пг/мл	1,000	0,124	2,471
	TNF- $\alpha$ баз. конц., пг/мл	1,000	0,049	4,115
	CD 3	1,000	0,004	9,129
	CD 8	1,000	0,869	0,028
	CD 4	1,000	0,021	5,748
	CD16+ CD56+ <sup>low</sup> клетки (%)	1,000	0,000	28,237
	CD19+	1,000	0,923	0,010
1	IL-2 баз. конц., пг/мл	0,986	0,114	15,973
	IL-4 баз. конц., пг/мл	0,980	0,081	16,474
	TNF- $\alpha$ баз. конц., пг/мл	0,975	0,364	14,486
	CD 3	0,595	0,723	13,882
	CD 8	0,988	0,570	14,051
	CD 4	0,773	0,907	13,786
	CD19+	0,993	0,797	13,831
2	IL-2 баз. конц., пг/мл	0,923	0,260	11,502
	TNF- $\alpha$ баз. конц., пг/мл	0,967	0,474	11,025
	CD 3	0,593	0,682	10,812
	CD 8	0,976	0,468	11,034
	CD 4	0,765	0,956	10,710
	CD19+	0,987	0,702	10,798

Таблица 56

Шаг		толерантность	p	Min. F
1	CD16+ CD56+ <sup>low</sup> клетки (%)	1,000	0,000	
2	CD16+ CD56+ <sup>low</sup> клетки (%)	0,980	0,000	2,471
	IL-4 баз. конц., пг/мл	0,980	0,081	28,237

Для определения относительного вклада каждой переменной в значение дискриминантной функции, с учетом влияния остальных переменных, входящих в модель, были рассчитаны нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции (табл. 57).

Таблица 57

Нормированные коэффициенты канонической дискриминантной функции

(группирующий признак – дистиреоз)	
	функция
	1
IL-4 баз. конц., пг/мл	0,409
CD16+ CD56+ <sup>low</sup> клетки (%)	0,973

Учитывая абсолютные значения коэффициентов показано, что наибольший вклад в значение дискриминантной функции, разделяющей группы лиц с АИТП в фазе эутиреоза от пациентов в фазе гипо/тиротоксикоза (дистиреоз) вносил показатель продукции мононуклеарными лейкоцитами крови IL-4 (табл. 58).



Таблица 58

Коэффициенты канонической дискриминантной функции	
	функция
	1
IL-4 баз. конц., пг/мл	0,248
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>low</sup> (%)	0,303
константа	-9,128

Таким образом, было получено каноническое дискриминантное уравнение:

$$\text{КЛДФ (d)} = -9,128 + 0,248 * \text{IL-4} + 0,303 * \text{CD16}^+ \text{CD56}^{\text{low}}\text{-клетки (\%)}.$$

При расчете центроидов (значений функции, получаемых при подстановке в дискриминантное уравнение средних значений показателей в группе) получены следующие значения: - 1,066 – для пациентов с АИТП в стадии дистиреоза и 0,520 – для пациентов с эутиреоидным АИТ (табл. 59).

Таблица 59

Координаты центроидов при расчете дискриминантной функции	
1 - эутиреоз, 2 - дистиреоз	значение функции
	1
1	0,520
2	-1,512

Результаты классификации, рассчитанные по обучающей выборке, показали, что точность диагностики по созданному решающему правилу 88,9%, чувствительность уравнения (процент лиц правильно отнесенных к группе дистиреоза)– 85% и специфичность (лиц правильно отнесенных к группе пациентов АИТ в фазе эутиреоза) – 91% (табл. 60).

Таблица 60

Результаты классификации					
		1 - эутиреоз, 2 - дистиреоз	прогнозируемый диагноз		всего
			1	2	
обучающая выборка	абс.	1	29	3	32
		2	7	39	46
	%	1	90,6	9,4	100,0
		2	15,4	84,6	100,0

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболевания эндокринной системы - одна из важнейших проблем современной медицины. В структуре эндокринной патологии лидирующее положение занимают сахарный диабет и патология щитовидной железы. Результатом исследований в этой области явилось понимание роли аутоиммунитета в индукции большинства нозологий эндокринных заболеваний. Аутоиммунный процесс представляет достаточно сложную проблему в клинике эндокринных заболеваний, требуя адекватных диагностических подходов и расшифровки молекулярных механизмов индукции и прогрессирования процесса, что позволит предложить новые терапевтические технологии для клинической медицины.

В последние десятилетия успешно реализованы программы по улучшению диагностики в эндокринологии, освещались отдельные механизмы формирования осложнений при различных эндокринных заболеваниях, однако полного понимания молекулярных механизмов индукции заболевания, патоморфоза, хронизации аутоиммунного процесса до сих пор нет.

В настоящее время в литературе накоплен значительный фактический материал, в котором представлено непосредственное участие иммунной системы в патогенезе аутоиммунной тиреопатии и сахарного диабета 1 типа. В частности молекулярная мимикрия и генетическая предрасположенность уже описаны как основные механизмы, лежащие в основе вышеуказанных заболеваний. Более того, в реализации предрасположенности подтверждена особая роль генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-комплекса) [Кандроп, 2004; Watanabe M et al., 2002]. Состояние иммунитета занимает одну из ключевых позиций в индукции, определении характера течения (бессимптомное носительство аутоантител, клинически выраженные формы заболевания) и исходов аутоиммунных реакций в органах-мишенях. Генетически обусловленные дефекты иммунокомпетентных клеток под влиянием экзогенных и

эндогенных факторов могут инициировать срыв естественной толерантности и развитие аутоиммунного процесса. Предрасполагающими факторами индукции аутоиммунитета также могут являться нарушения иммунного и эндокринного гомеостаза, угнетение апоптоза аутореактивных лимфоцитов, способность ряда цитокинов индуцировать повышенную экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости клетками тиреоидной ткани, инсулярными клетками поджелудочной железы.

Механизм, с помощью которого ауто-антигены (ауто-АГ) реализуют свои ауто-АГ и иммуногенные свойства, до конца не ясен. На сегодняшний день можно выделить несколько таких возможных механизмов, имеющих значение для понимания ранних стадий развития аутоиммунных заболеваний [Quarantino S., Ruf J., Osman M et al., 2005].

- аберрантная экспрессия молекул HLA класса II,
- посттрансляционная модификация аутоантигенов с образованием неопептидов,
- спонтанное образование суперантигенов с последующей поликлональной активацией иммуноцитов,
- молекулярная мимикрия, когда пептиды микробного происхождения имеют структурное сходство с аутоантигенами, а специфические клоны иммуноцитов реагируют и на чужеродный, и на собственный аутоантиген в сопоставимых масштабах.

Первыми после антигенной стимуляции у больных с аутоиммунными заболеваниями начинают функционировать две группы клеток: клетки с цитотоксическим в отношении органа-мишени эффектом (аутореактивные цитотоксические Т-лимфоциты/ЦТЛ) и В-лимфоциты, которые, перемещаясь в орган-мишень, начинают продуцировать широкий спектр аутоантител, в том числе с цитотоксическим эффектом. Длительный процесс аутоагрессии ведет к снижению функции. Считается, что ведущим патогенетическим механизмом, ответственным за развитие аутоиммунного

воспаления в органе-мишени в целом, является цитотоксический эффект ЦТЛ. В то же время аутоантителам среди патогенетических механизмов развития аутоиммунного воспаления отводится не последняя роль: такого рода АТ, направленные против нативных детерминант аутоантигенов, определяют в противовес клеточным механизмам аутоагрессии, не начало заболевания, а скорее его прогрессирование [Weetman A.P., 2004].

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

Считалось, что аутоиммунное воспаление, лежащее в основе АИТ и СД1, развивается преимущественно по Th1 типу иммунного ответа с преобладанием продукции цитокинов Th1 профиля, которые стимулируют цитотоксическое воздействие иммуноцитов на гормон-продуцирующие клетки желез и, в последующем, развитие гипофункции эндокринной железы [Кандроп В.И., 2008; Dardalhon V., 2008; Poncin S. et al., 2008]. Тогда как, для LADA и БГ свойственно преобладание в патогенезе роли Th2 иммунного ответа, способствующего развитию гиперфункции щитовидной железы в случае БГ и длительную сохранность продукции инсулина при

LADA [Кандроп В.И., 2008; Gianoukakis A.G. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2010].

Полученный в ходе исследования комплекс феноменологических данных, касающийся параметров клеточного иммунитета и системы цитокинов при различных клинических вариантах аутоиммунного сахарного диабета (СД1 манифестного течения и LADA), доказывает общность основных иммунопатологических реакций, лежащих в основе этих заболеваний и существенные отличия, результатом которых является более «мягкий» и «доброкачественный» характер аутоиммунного инсулита при LADA и длительное угасание эндогенной секреции инсулина (см. рис. 43, приложение 1).

На этапе индукции органоспецифических аутоиммунных заболеваний важную роль отводят подверженности лимфотропным вирусным инфекциям. Так дефекты врожденного иммунитета обуславливают у генетически предрасположенных лиц частые и длительные периоды виремии, которые в свою очередь вызывают абберантную экспрессию молекул адгезии и антигенов гистосовместимости (HLA) II класса на поверхности  $\beta$ -клеток, появление антигенной мимикрии, могут приводить к срыву периферической ауто-толерантности за счет появления «запрещенных» клонов аутореактивных лимфоцитов. У пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом регистрировалось снижение количества лимфоцитов за счет снижения абсолютного количества  $CD16+CD56^{low}$  – клеток, причем максимально низкие показатели зафиксированы у пациентов с LADA. По-видимому, снижение количества натуральных киллеров-иммунологический дефект, приводящий к риску индукции аутоиммунных заболеваний, в том числе и множественных локализаций, что продемонстрировано у пациентов с LADA, у которых достоверно чаще развивалось 2-е органоспецифическое заболевание - АИТ (32% против 5% в группе СД1 манифестного течения) (рис. 43).

Аутоиммунный сахарный диабет		
Клинические и метаболические особенности	сахарный диабет 1 типа манифестного течения	латентный аутоиммунный сахарный диабет:
	Ассоциация с аутоиммунным тиреоидитом в 5,4%	высокая частота ассоциации заболевания с аутоиммунным тиреоидитом - 32%
	снижением базальной и стимулированной секреции С-пептида с момента манифестации клинических признаков	снижением базальной и стимулированной секреции С-пептида после 4 года заболевания
	Прямая корреляционная зависимость между титром антител к ICA с высокой скоростью снижения эндогенной секреции инсулина.	

Иммунологические особенности	↑CD3+-лимфоцитов, ↓ CD16+CD56 <sup>low</sup> -лимфоцитов и ↓CD8+-лимфоцитов	
		Уменьшение количества CD19+-лимфоцитов относительно CD1 манифестного течения
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑секреции IL-4 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами in vitro</li> <li>• ↑количества IL-4R+ -несущих лимфоцитов</li> <li>• дисбаланс системы цитокинов-регуляторов апоптоза с ↑количества TNF-RI+ и FasL+- лимфоцитов и относительным повышением содержания sTNF-RI</li> </ul>
	Преобладание антител к инсулину (IAA) -37,8%	• преобладанием антител к ICA (71%) и GAD (39%)
	Потребность в заместительной инсулинотерапии с момента манифестации заболевания	Потребность в инсулине у 80% через 4 года после манифестации сахарного диабета

Особенности формирования микроангиопатий	На фоне стабильно сниженной концентрации С-пептида	Быстрое снижение концентрации С-пептида после 4-го года заболевания
	Увеличение IL-2-секретирующей активности МНК и ↑количества CD25+-лимфоцитов	Более выраженное увеличение IL-2-секретирующей активности МНК и сравнимое ↑количества CD25+-лимфоцитов
		↑секреции IL-4 МНК и ↑CD124+-лимфоцитов
		↑секреции TNF-αМНК и ↑TNF-RI+-лимфоцитов
	Медиана продолжительности заболевания до формирования микроангиопатий -8 лет	Медиана продолжительности заболевания до формирования микроангиопатий -4 года

**Рис. 43.** Схема клинических, метаболических, иммунологических различий между аутоиммунным сахарным диабетом манифестного течения и латентным аутоиммунным диабетом (по результатам собственных исследований)

На этапе индукции аутоиммунного инсулита важны также количество и функциональные свойства В-лимфоцитов, которые не только вовлечены в продуктивную фазу аутоиммунного воспаления, но и выполняют функции АПК в островке Лангерганса. Уменьшение количества В-клеток относительно контроля и у пациентов с СД1 типа, также у пациентов с LADA, может быть обусловлено перераспределением их в орган-мишень (островок Лангерганса), реагированием на эпитопы  $\beta$ -клеток и хронизацией аутоиммунного воспаления, а может быть обусловлено истощением циркулирующего пула, вследствие более выраженной функциональной нагрузки на В-звено иммунитета и более выраженной антителопродукции при данном варианте аутоиммунного диабета. Тем не менее, вопрос участия В-клеток в качестве АПК при LADA требует, несомненно, дальнейшего изучения.

На этапе прогрессирования (усиления) аутоиммунного воспаления важная роль отводится Т-лимфоцитам, которые вследствие многих факторов, в том числе и цитокинового репертуара, способны к дальнейшей дифференцировке в направлении Th/Th2/Th3 фенотипа. Преобладание Th1 и Th3-хелперных лимфоцитов способствует быстрому переходу иммунологического сценария к деструктивной фазе органоспецифического воспаления, опосредованной в основном клеточными механизмами. Цитокинами Th1-хелперного отклонения являются IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ .

У пациентов с обоими вариантами аутоиммунного сахарного диабета регистрировалось повышение секреции IFN- $\gamma$ , отсутствие изменений в базальной секреции TNF- $\alpha$  мононуклеарными клетками *in vitro*, что уравнивает провоспалительный потенциал у пациентов с СД1 и LADA. Однако, анализируя показатели секреции IL-2 мы видим усиление биологических эффектов цитокина у пациентов с LADA, а также прямые корреляционные связи повышения секреции IL-2 и лучшего уровня эндогенной секреции инсулина, что фиксировалось по показателям



базальной и стимулированной концентрации С-пептида в сыворотке пациентов с аутоиммунным СД. Таким образом, из всех эффектов данного цитокина преобладают, видимо, эффект поддержания периферического пула регуляторных Т-лимфоцитов, ограничивающих пролиферацию аутоагрессивных цитотоксических лимфоцитов, что можно считать одним из протективных факторов, приводящих к более мягкому течению аутоиммунного инсулита при LADA.

У пациентов с обоими вариантами аутоиммунного СД регистрировалось одинаково выраженное повышение количества TNF-RI-экспрессирующих лимфоцитов и максимально выраженное снижение концентрации растворимой формы «рецептора-ловушки» sTNF-RI у пациентов с манифестным СД1. Таким образом, при прочих равных условиях у пациентов LADA создается более «благоприятный» фон в этой системе, приводящий к уменьшению биологических эффектов TNF- $\alpha$  непосредственно в органе-мишени и возможно, «смягчению» деструктивной фазы аутоиммунного инсулита у пациентов LADA. Повышение количества лимфоцитов, несущих TNF-RI может способствовать элиминации аутореактивных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов при СД1 и LADA, преобладанию CD4<sup>+</sup>-хелперных лимфоцитов, репертуар которых будет зависеть от баланса соответствующих цитокинов (рис. 43, приложение 1).

Самыми яркими изменениями у пациентов LADA являются изменения секреции и рецепции цитокина Th2-профиля – IL-4, а также секреции IL-10. Данные изменения приводят, по-видимому, к формированию «толерантного» Th2-фенотипа за счет подавления дифференцировки Th1-лимфоцитов, снижению АТ-зависимой цитотоксичности в органе-мишени, тем самым ослабляя деструктивную фазу аутоиммунного инсулита при LADA. Вероятно также, что максимально выраженная секреция IL-10 при LADA приводит к

торможению пролиферативного ответа Т-клеток на антигены и аутоантигены, подавляет продукцию IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами и других провоспалительных цитокинов, участвующих в деструктивной фазе аутоиммунного инсулита.

И наконец, анализируя систему Fas/FasL/sFasL у пациентов с различными вариантами аутоиммунного СД, отмечена максимальная степень активации всех ее компонентов при LADA. Механизмами протективного влияния активации данной сигнальной системы при LADA могут быть: более эффективная элиминация Th1-клеток из циркуляции вследствие Fas/FasL-опосредованного апоптоза (Th2-клетки устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу), а также элиминация аутореактивных Т-лимфоцитов памяти, что может ограничивать хронизацию аутоиммунного инсулита.

Также интересны общие и специфические особенности иммунопатогенеза АИТП (БГ и АИТ), выявленные нашим исследованием и определяющие вектор дальнейших исследований, которые позволят выйти на создание иммуно-интервенционных технологий при данных заболеваниях эндокринной системы.

Известно, что в щитовидной железе больных болезнью Грейвса (БГ), также как и при АИТ, обнаруживается лимфоидная инфильтрация. Большинство внутритиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса – это Т-лимфоциты, а В-клеточные конгломераты встречаются гораздо реже, чем, например, при хроническом лимфоцитарном тиреоидите. Деструкция фолликулов, характерная для АИТ, отсутствует. Чем больше выражена очаговая лимфоидная инфильтрация, тем большими оказываются рост и пролиферация тиреоцитов. Найдена корреляция между степенью лимфоидной инфильтрации щитовидной железы при БГ и экспрессией маркера пролиферации Ки-67 (Ki-67) на тиреоцитах. В отличие от АИТ, среди клеток лимфоидного инфильтрата при БГ преобладают так

называемые Т-хелперы 2 типа (а не Т-хелперы 1 типа или цитотоксические Т-лимфоциты), которые секретируют в основном IL-4 и стимулируют продукцию антител В-лимфоцитами. При других же аутоиммунных заболеваниях активируются в основном Т-хелперы 1 типа, которые секретируют главным образом IFN- $\gamma$  и стимулируют цитотоксические реакции. Функциональные исходы АИТП зависят от свойств ауто-антител: антитела к рецептору ТТГ являются АТ с функциональным ресурсом, стимулируя функциональную активность (гормоногенез) ЩЖ при БГ и приводят к развитию синдрома гипертиреоза. При АИТ преимущественно повышается титр АТ-ТПО. В отличие от анти-ТГ, и тем более АТ-рТТГ, анти-ТПО ауто-АТ обладают выраженной способностью индуцировать цитотоксичность и вызывать деструктивные процессы в ткани ЩЖ [Кандрор В.И., 2008]. Постоянно выявляется прямая корреляция между титром этих АТ и гистологическими изменениями в ЩЖ, которые имеются и при АИТ, и при БГ [Rose N.R., Burek C.L., 2000]. В нашем исследовании подтверждена функциональная взаимосвязь между титром АТ-ТПО и цитотоксическим потенциалом клеточного иммунитета, так, среди всех пациентов с АИТП обнаруживалась умеренной силы прямая корреляционная связь титра АТ-ТПО и абсолютным количеством CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $r=0,41$ ;  $p=0,03$ ), а также абсолютным количеством CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $r=0,38$ ;  $p=0,04$ ). Подобных ассоциаций не выявлено между параметрами клеточного иммунитета при АИТП и титром АТ-рТТГ, АТ-ТГ.

Подобно аутоиммунному сахарному диабету при АИТП в нашем исследовании также обнаруживалось снижение количества НК-клеток, что может быть значимым фактором индукции и прогрессирования органоспецифических аутоиммунных заболеваний. Повышение количества Т-хелперных лимфоцитов (CD4<sup>+</sup>), цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у пациентов с АИТ относительно группы контроля и пациентов с БГ, свидетельствует о большей активации клеточного иммунитета при данном

варианте АИТП. Следствием этого может быть усиление ЦТЛ-опосредованных реакций в органе-мишени, и усиление деструктивной фазы воспаления при АИТ (рис. 44, приложение 1).

В отличие от аутоиммунного СД при АИТП динамика продукции IL-2 зависела не от варианта АИТП, а от функционального состояния ЩЖ, количество лимфоцитов, несущих рецептор к данному цитокину значительно снижался у пациентов с БГ, независимо от фазы заболевания.

Маркеры Th2-иммунного отклонения фиксировались как при БГ (что считалось признаком БГ), так и при АИТ, что отразилось на повышении количества CD124+лимфоцитов (при БГ и АИТ) и В-лимфоцитов (при АИТ). Одновременно со снижением CD25+-несущих лимфоцитов, увеличение количества CD124+лимфоцитов при БГ, дает большую выраженность Th2-иммунного отклонения, нежели при АИТ. В связи с этим в органе-мишени будут преобладать эффекторные реакции гуморального типа (антителопродукция) над клеточно-опосредованными цитотоксическими реакциями, что обуславливает пролиферативную направленность морфологических исходов при БГ, и наоборот, деструктивных, при АИТ.

Самыми перспективными с точки зрения возможности управления морфо-функциональными исходами при АИТП, являются изменения, обнаруженные в системе TNF- $\alpha$ . Система «лиганд-рецептор» фактора некроза опухолей альфа была угнетена при обоих вариантах АИТП. При анализе иммуногистохимической детекции рецептора TNF- $\alpha$  в паренхиме ЩЖ, как морфологической основе для проведения сигналов цитокина и обеспечения его функциональных эффектов (угнетение пролиферации тиреоцитов и ингибирование NIS/захвата йода), было зарегистрировано отсутствие специфического свечения в клетках фолликулярного эпителия.

Аутоиммунные тиреопатии		
Иммунологические особенности	Аутоиммунный тиреоидит	Болезнь Грейвса
	↑CD3+-лимфоцитов, ↓CD16+CD56 <sup>low</sup> -лимфоцитов	
	↑CD4+- лимфоцитов, ↑CD8+-лимфоцитов	<b>В фазе гипертиреоза-</b> ↑CD4+- лимфоцитов, ↑CD8+-лимфоцитов
	Корреляционная зависимость между титром АТ-ТПО и количеством CD8 <sup>+</sup> -лимфоцитов (r=0,41; p=0,03) и количеством CD4 <sup>+</sup> -лимфоцитов (r=0,38; p=0,04). Отсутствие связи титра АТ-ТГ и АТ-рТТГ с параметрами клеточного иммунитета	
	IL-2-секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов зависит от концентрации тиреоидных гормонов: ↓-при гипотиреозе, ↑-при гипертиреозе.	
		↓CD25+-лимфоцитов независимо от функционального состояния щитовидной железы
	↑CD124+-лимфоцитов при отсутствии изменений в IL-4-секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов	
	Супрессия всех компонентов системы «лиганд-рецептор» TNFα: ↓ базальной и митоген-стимулированной продукции цитокина мононуклеарными лейкоцитами крови, ↓концентрации sTNF-R1, ↓TNF-R1-лимфоцитов	
Клинические и иммуно-морфологические параллели	Экспрессия CD25+, CD124+, TNF-RI иммуноцитами, инфильтрирующими паренхиму щитовидной железы, CD25+, CD124+-клетками фолликулярного эпителия щитовидной железы	
	Экспрессия CD25+ коррелирует со степенью выраженности пролиферативных процессов в паренхиме щитовидной железы	
		<p><b>1-ый гистологический вариант</b> (максимально выраженное Th2-иммунное отклонение среди 3-х вариантов): ↑ секреции IL-2 и IL-4 мононуклеарными лейкоцитами in vitro, ↑CD124+-лимфоцитов и ↓CD25+лимфоцитов Клинический фенотип болезни Грейвса с более молодым возрастом дебюта (&lt;30 лет), выраженным увеличением объема щитовидной железы (&gt;40 мл) и синдрома гипертиреоза, высокий титр анти-рТТГ</p> <p><b>3-ий гистологический вариант:</b> активация супрессированной системы «лиганд-рецептор» TNF-α относительно других вариантов. Клинический фенотип болезни Грейвса с «мягким» течением синдрома гипертиреоза, более старший возраст манифестации заболевания (&gt;50 лет), меньшим объемом щитовидной железы (&lt;30 мл), меньший титр анти-рТТГ и относительно больший- анти-ТПО</p>

**Рис. 44.** Схема клинических, гормональных, иммунологических различий между аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса (по результатам собственных исследований)

Маркер идентифицировался на моноклеарных клетках воспалительного инфильтрата. При морфологическом анализе данный тип клеток отнесен к клеткам моноцитарно-макрофагальной линии.

Интересны клинико-морфологические параллели с цитокинпродуцирующей и рецепторной активностью моноклеарных клеток крови при БГ. Известно, что в ЩЖ могут параллельно протекать процессы, свойственные для БГ и АИТ. При стратификации операционного материала ЩЖ пациентов с БГ, подвергнутых оперативному лечению на 3 гистологических варианта, при 3-м варианте с минимальной активностью признаков, характерных для БГ (зоб, выраженность аутоиммунного тиреотоксикоза, титр антител к рецептору ТТГ) и клинико-лабораторными маркерами АИТ (большой титр АТ к ТПО, «мягкий» гипертиреоз, меньшие объем железы и онкоцитарная перестройка тиреоидного эпителия) регистрировалось менее выраженное подавление системы «лиганд-рецептор» TNF- $\alpha$ : относительно других вариантов большая секреция TNF- $\alpha$  культурой моноклеарных лейкоцитов, большее количество лимфоцитов, несущих TNF-RI и самые низкие концентрации рецептора - «ловушки», ограничивающего биологический ответ на TNF клетками (рис. 44, приложение 1).

Эти результаты указывают на менее выраженное ингибирование системы цитокина и его рецепторов в иммунопатогенезе АИТ, нежели БГ. Аналогично нашим данным, результатами последних лет [Yamamoto K, Itoh M, Okamura T, Kimura M и др., 2012] показано, что средние концентрации TNF- $\alpha$  относительно выше при ремиссии БГ, нежели активной фазе заболевания и при тяжелой рефрактерной к терапии БГ, а концентрация sCD40L (выделяемого активированными Т-клетками и являющегося маркером активности аутоиммунного воспаления при БГ), наоборот, ниже. Эти данные указывают на переключение Th2 – ответа на Th1- хелперный ответ, необходимый для индукции ремиссии при БГ. Также были выявлены

самые высокие сывороточные концентрации рецепторов - «ловушек» TNF-RI и TNF-RI у пациентов с активной фазой БГ, нежели у пациентов в ремиссии БГ и неактивной фазе. Таким образом, общее заключение по системе TNF- $\alpha$  при БГ заключается в следующем – подавление этой системы связано с самим заболеванием (БГ) и с выраженностью его проявлений, и наоборот, активизация этой системы свидетельствует о переключении на «благоприятный» для БГ Th1-хелперный ответ и ассоциирована с «мягким» клиническим течением БГ и появлением морфологических черт АИТ.

Таким образом, результаты нашего исследования обобщают и существенно дополняют механизмы формирования клинической гетерогенности аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий. Дальнейшая расшифровка механизмов влияния дисбаланса клеточных факторов иммунитета и цитокинов на характер течения аутореактивного воспалительного ответа может позволить разработать методы иммунотерапии и иммунопрофилактики, направленные на коррекцию (компенсацию) непосредственной причины дисрегуляции. Главными кандидатами для такой терапии являются препараты на основе рекомбинантных аналогов цитокинов.

## ВЫВОДЫ

1. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови при эндокринопатиях аутоиммунного генеза имеет общие (увеличение абсолютного количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, уменьшение CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>low-клеток) и специфические для каждой нозологии изменения:
  - при аутоиммунных вариантах сахарного диабета (сахарный диабет 1 типа и латентный аутоиммунный диабет взрослых) уменьшение абсолютного количества CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов по сравнению со значениями данного показателя у больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых доноров; у пациентов с латентным аутоиммунным диабетом взрослых снижено абсолютное количество CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно значений у пациентов с сахарным диабетом 1 типа;
  - аутоиммунный тиреоидит сопровождается увеличением абсолютного количества CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток, независящим от функционального состояния щитовидной железы (гипотиреоз, эутиреоз); болезнь Грейвса характеризуется увеличением количества данных субпопуляций клеток только в фазе гипертиреоза, что отражает влияние тиреоидных гормонов на процессы активации лимфоцитов.
2. Латентный аутоиммунный сахарный диабет характеризуется преобладанием среди серологических маркеров заболевания антител к ICA (71%) и GAD (39%), высокой частотой ассоциации с аутоиммунным тиреоидитом (32%), снижением базальной и стимулированной секреции С-пептида после 4-го года заболевания, а также корреляционной зависимостью между титром антител к ICA с высокой скоростью снижения эндогенной секреции инсулина.
3. Латентный аутоиммунный сахарный диабет сопровождается изменением параметров иммунной системы, которые могут



обуславливать медленные темпы развития инсулиновой недостаточности по сравнению с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения: повышение концентраций IL-4 и IL-10 в кондиционных средах культур моноклеарных лейкоцитов, увеличение количества IL-4R<sup>+</sup> -несущих лимфоцитов; дисбаланс в системе цитокинов-регуляторов апоптоза (увеличение количества TNF-RI<sup>+</sup> и FasL<sup>+</sup> лимфоцитов и повышение содержания sTNF-RI в кондиционных средах культур моноклеарных лейкоцитов).

4. У пациентов с латентным сахарным диабетом взрослых диабетические микроангиопатии развиваются раньше (медиана - 4 года), чем у пациентов с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения (медиана - 8 лет). Патогенез диабетических микроангиопатий при латентном сахарном диабете взрослых сопряжен с сочетанием метаболических (продолжительное снижение базальной концентрации С-пептида) и иммунологических изменений (повышение секреции *in vitro* моноклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  и увеличение количества лимфоцитов, презентующих комплементарные им рецепторы), определяющих темпы формирования и клиническую выраженность эндотелиальной дисфункции.
5. Признаком дисбаланса системы цитокинов при аутоиммунных тиреопатиях являются увеличение количества CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов при отсутствии изменения секреции IL-4, а также угнетение компонентов системы «лиганд-рецептор» TNF- $\alpha$ . Содержание IL-2 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов снижено при гипотиреозе, повышено - при гипертиреозе, что отражает влияние тиреоидных гормонов на степень активации Th-лимфоцитов. Для пациентов с болезнью Грейвса характерно уменьшение количества

CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, как в фазе гипертиреоза, так и в фазе медикаментозно индуцированного эутиреоза.

6. IL-2-секретирующая функция мононуклеарных лейкоцитов сопряжена с изменением концентрации тиреоидных гормонов у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (снижается при гипотиреозе и повышается – при гипертиреозе) и не зависит от нозологического варианта аутоиммунного заболевания щитовидной железы, а при сахарном диабете – с выраженностью гипергликемии (повышается при декомпенсации углеводного обмена).
7. Инфильтрирующие паренхиму щитовидной железы иммунокомпетентные клетки экспрессируют три вида рецепторов цитокинов (TNF-RI, IL-2R, IL-4R), в то время как фолликулярным эпителием – только рецепторы к IL-2 и IL-4 (IL-2R, IL-4R). Увеличение экспрессии IL-2R клетками фолликулярного эпителия щитовидной железы сопряжено с выраженностью пролиферативных процессов в щитовидной железе независимо от варианта аутоиммунного заболевания.
8. Увеличение экспрессии TNF-RI мононуклеарными лейкоцитами, инфильтрирующими ткань щитовидной железы, сопряжено с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия, что связывает эффекты TNF- $\alpha$  и структурно-функциональные изменения в щитовидной железе при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса.
9. Первый гистологический вариант перестройки паренхимы щитовидной железы при болезни Грейвса сопряжен с изменениями баланса цитокинов Th1/Th2-профиля (сочетание повышенной секреции IL-2 и IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*, увеличение количества CD124<sup>+</sup>-лимфоцитов и уменьшение количества CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов) и фенотипа клинического течения заболевания:

молодой возраст пациентов (26[24-36] лет), большой объем щитовидной железы (55,3[42-64] мл), выраженный синдром гипертиреоза (уровень ТТГ 0,01[0,01-0,01] мМЕ/л), выраженная продуктивная фаза аутоиммунного воспаления с преимущественной продукцией антител к рецептору ТТГ (49,8[34,6-57,5] мМЕ/мл) и относительно низким титром антител к ТПО (397,4[31,9-762,0] МЕ/л) по сравнению со вторым и третьим гистологическими вариантами болезни Грейвса.

10. У пациентов с болезнью Грейвса степень супрессии системы «лиганд-рецептор» TNF- $\alpha$  наиболее значима при первом гистологическом варианте перестройки паренхимы, наименее – при третьем (появление онкоцитарной трансформации тиреоидного эпителия). Активация системы данного цитокина ассоциирована с клиническим фенотипом течения болезни Грейвса, характеризующимся: старший возраст пациентов (53[46-55] года), меньший объем железы (24,0[14,2-28,3] мл), меньшая выраженность синдрома гипертиреоза (ТТГ 0,05[0,03-0,06] мМЕ/л), большей степенью повышения титра АТ к ТПО (990,1[824,2-1156,0] МЕ/л) и меньшей - антител к рецептору ТТГ (17,9 [8,0-20,0] мМЕ/мл) по сравнению с первым вариантом перестройки паренхимы. Данный клинический фенотип сопровождается затягиванием медикаментозного этапа лечения пациентов с болезнью Грейвса (свыше 1,5 лет).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выделения больных латентным сахарным диабетом взрослых среди пациентов с гормонально-метаболическим фенотипом сахарного диабета типа 2 целесообразно одновременно определять в сыворотке крови два типа аутоантител (к ICA и GAD), а также использовать комплекс иммунологических параметров (уровень продукции IL-2, TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами, количество циркулирующих CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов).
2. Пациентам с сахарным диабетом и повышенным титром антител к ICA следует проводить мониторинг концентрации С-пептида натощак, особенно у больных с длительностью заболевания более 4-х лет. Данной категории пациентов целесообразно раннее назначение инсулинотерапии.
3. Высокая частота ассоциации латентного аутоиммунного сахарного диабета взрослых и аутоиммунного тиреоидита требует проведения у пациентов с данным заболеванием регулярного скрининга, включающего ультразвуковое исследование щитовидной железы, определение в сыворотке крови уровня тиреотропного гормона (ТТГ) и антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО).
4. Применение метода многофакторного дискриминантного анализа с учетом наиболее значимых показателей клинического фенотипа, а также иммунологических параметров, позволяет относить больных в группы с эндокринопатиями аутоиммунного генеза:
  - пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом (секреция IL-2, TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами и количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов);
  - пациентов с аутоиммунными тиреопатиями (количество CD16+CD56<sup>low</sup>-лимфоцитов, количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, а

также TNF- $\alpha$ -секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов);

а также дифференцировать между отдельными вариантами аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунными тиреопатиями:

- пациентов с латентным аутоиммунным диабетом от пациентов с сахарным диабетом 1 типа манифестного течения (возраст пациента и возраст дебюта заболевания, окружность талии, концентрация IL-10 в культуре мононуклеарных лейкоцитов);
- пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса (количество CD16+CD56<sup>low</sup>-лимфоцитов, TNF- $\alpha$ - и IL-2-секретирующая активность мононуклеарных лейкоцитов).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$\sigma$	стандартное отклонение
AICD	индуцированная активацией клеточная гибель (activation-induced cell death)
ANOVA	вариационный анализ (analysis of variance)
АТР III	третий отчет экспертной панели по обнаружению, оценке и лечению гиперхолестеринемии у взрослых (Adult treatment panel, third report)
CD	(cluster of differentiation) кластер дифференцировки
ELISA	твердофазный иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay)
GAD65	Декарбоксилаза глутаминовой кислоты, изофермент 65 кДа
GAD65Ab	антитела к глутаматдекарбоксилазе
HbA1c	гликированный гемоглобин A1c
HLA	антигены главного комплекса гистосовместимости (human leucocyte antigens)
IA-2	протеин-гомолог тирозинфосфатазы
IA-2Ab	антитела к протеину-гомологу тирозинфосфатазы
IAA-Ab	(insulin - autoantibody) аутоантитела к инсулину
ICA	(islet-cell antibodies) антитела к $\beta$ -клеткам поджелудочной железы
IFN- $\gamma$	интерферон $\gamma$
IL	(interleukin) интерлейкин
IL-1	интерлейкин 1
IL-10	интерлейкин 10
IL-10R	рецептор интерлейкина 10
IL-12	интерлейкин 12
IL-12R	рецептор интерлейкина 12
IL-2	интерлейкин 2

IL-2R $\alpha$ -	$\alpha$ субъединица рецептора интерлейкина 2
IL-4	интерлейкин 4
IL-4R $\alpha$ -	$\alpha$ субъединица рецептора интерлейкина 4
JAK	(Janus-associated kinase) киназа семейства Janus
JNK	(Jun N-terminal kinase) киназа, фосфорилирующая фактор c-jun
LADA	Медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)
M	среднее значение
m	ошибка среднего
MAP	(mitogen-activated protein) митоген-активируемая протеинкиназа
Me	медиана
NF- $\kappa$ B	Ядерный фактор $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)
NIS	(Na/I-simporter) натрий-йодный симпортер
NK	(natural killer) лимфоциты натуральные киллеры
NKT	естественные CD3 <sup>+</sup> -киллеры
NO	оксид азота
NOD	линия мышей, у которых в отсутствие ожирения спонтанно развивается СД (Non-obese diabetes mice), модель СД1
p	уровень статистической значимости
Q <sub>1</sub> и Q <sub>3</sub>	первый и третий квартили
r	коэффициента ранговой корреляции Спирмена
SOCS	(suppressor of cytokine signaling) регулятор цитокинового сигнала
sTNF-RI	(soluble tumor necrosis factor $\alpha$ receptor) растворимый рецептор фактора некроза опухолей $\alpha$ первого типа
TGF $\beta$	(transforming growth factor $\beta$ ) трансформирующий фактор роста $\beta$
TRAIL	лиганд, имеющий значительную гомологию с FasL
Th	(T-helper) Т-хелпер

Th1	CD3+-хелперы 1 типа
Th2	CD3+-хелперы 2 типа
TNF-R1	рецептор фактора некроза опухолей 1 типа
TNF- $\alpha$	(tumor necrosis factor $\alpha$ ) фактор некроза опухолей $\alpha$
Treg	регуляторные CD3+-клетки
ZnT8	транспортер цинка ZnT8
ZnT8Ab	антитела к транспортеру цинка ZnT8
АД	артериальное давление
АИТ	аутоиммунный тиреоидит
АПК	антиген-презентирующая клетка
АТ-ТГ	антитела к тиреоглобулину
АТ-ТПО	антитела к тиреоидной пероксидазе
БГ	болезнь Грейвса
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ГАМК	$\gamma$ -аминомасляная кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПП-4	Дипептидил-пептидаза 4 типа
ИМТ	индекс массы тела
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
МНЛ	моноклеарные лейкоциты
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
НТГ	нарушение толерантности к глюкозе
ОТ	окружность талии
ПГТТ	пероральный глюкозотолерантный тест
РИА	радиоиммунный анализ
рТТГ	рецептор тиреотропного гормона
св. Т <sub>3</sub>	свободная фракция трийодтиронина



св. T <sub>4</sub>	свободная фракция тироксина
СД	сахарный диабет
СД1	сахарный диабет, тип 1, с классическим дебютом
СД2	сахарный диабет, тип 2
СТТГ	стандартный тест толерантности к глюкозе
ТАБ-УЗИ	тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем ультразвукового исследования
ТГ	тиреоглобулин
ТМБ	тетраметилбензидин
ТПО	тиреоидная пероксидаза
ТТГ	тиреотропин
ТТСП	тест толерантности к смешанной пище
УЗИ	ультразвуковое исследование (сонография)
ФГА	фитогемагглютинин
ЦТЛ	цитотоксические лимфоциты
ЩЖ	щитовидная железа

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом: 6-й выпуск (репринт) // Сахарный диабет. – 2013. – № 1. – Прил. – С. 3–72.
2. Афифи, А. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ / А. Афифи, С. Эйзен. – М. : Мир, 1982. – 488 с.
3. Балаболкин, М.И. Возможна ли патогенетическая терапия сахарного диабета 2-го типа / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 50–56.
4. Балаболкин, М.И. Неотложные проблемы современной эндокринологии / М.И. Балаболкин // Качество жизни. Медицина. – 2006. – № 3. – С. 10–14.
5. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н.Н. Белушкина, С.Е. Северин // Архив патологии. – 2001. – № 1. – С. 51–60.
6. Бета-клетка: секреция инсулина в норме и патологии : Национальная группа по изучению секреции инсулина / под ред. И. И. Дедова. – М.: Сервье, 2006. – 124 с.
7. Болезни органов эндокринной системы / под ред. И.И. Дедова. – М. : Медицина, 2000. – 568 с.
8. Болезни щитовидной железы / под ред. Л.И. Браверманна. – М. : Медицина, 2000. – 432 с.
9. Боровиков, В.П. STATISTICA – статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М. : Филинь, 1997. – 608 с.
10. Владимирская, Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия (Лекция) / Е.Б. Владимирская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 11. – С. 25–32.
11. Волкова, Н.И. По материалам Европейского конгресса «Щитовидная железа и аутоиммунитет» / Н.И. Волкова // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2006. – Т. 2, № 4. – С. 2–9.
12. Геворкян, А.Г. Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса больных диффузным токсическим зобом и аутоиммунным тиреоидитом / А.Г. Геворкян, А.С. Цогоев, Л.З. Болиева // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – № 3. – С. 155–156.
13. Гемопоз, гормоны, эволюция / В.В. Новицкий, Ю.А. Козлов, В.С. Лаврова, Н.М. Шевцова. – Новосибирск, 1997. – 432 с.
14. Геномика – медицине / В.И. Иванов, Л.Л. Киселев – М. : Академкнига, 2005. – 392 с.

15. Глазанова, Т.В. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы: роль иммунологических и иммуногенетических факторов / Т.В. Глазанова, Л.Н. Бубнова, В.И. Мазуров // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 257–270.
16. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Прайма, 1998. – 459 с.
17. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. – Томск, 1992. – 272 с.
18. Дамбаева, И.М. Показатели иммунного статуса больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / И.М. Дамбаева, Д.Н. Санжеева, Т.Д. Шарапова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2007. – № 5. – С. 102–103.
19. Дедов, И.И. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы» / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2013. – № 2S. – С. 2–48.
20. Драник, Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология: учебник / Г.Н. Драник. – Одесса: АстроПринт, 1999. – 603 с.
21. Дрометр, Д.А. Иммунологические аспекты дифференциальной диагностики синдрома гипертиреоза / Д.А. Дрометр, И.А. Тузанкина, А.В. Кияев // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2007. – Т. 3, № 1. – С. 18–23.
22. Дрометр, Д.А. Иммунологические аспекты формирования патологических состояний щитовидной железы, сопровождающихся синдромом тиреотоксикоза (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Д.А. Дрометр. – Екатеринбург, 2009. – 25 с.
23. Жук, Е.А. Клинико-иммунологические аспекты сахарного диабета 1 типа (Характеристика субтипов, вариантов, терапии гипергликемического синдрома) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – 2000. – 37 с.
24. Зак, К.П. Иммунитет у детей, больных сахарным диабетом / К.П. Зак, Т.Н. Малиновская, Н.Д. Тронько. – Киев: Книга плюс, 2002. – 111 с.
25. Зак, К.П. Цитокины и сахарный диабет 1-го типа у человека / К.П. Зак, В.В. Попова // Украинский медицинский часопис. – 2006. – № 1. – С. 78–88.
26. Занозина, О.В. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности / О.В. Занозина, Н.Н. Боровков, Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 3. – С. 104–112.

27. Изменение иммунного статуса у больных диффузным токсическим зобом в динамике лечения тиреостатиками / А.А. Савченко, В.П. Мацынина, С.Г. Кадричева, С.А. Доганина // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23, № 1-3. – С. 30–33.
28. К механизмам пролиферации и гибели тиреоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы / В.И. Кандрор, С.И. Крайнова, И.В. Крюкова, Н.А. Мкртумова // Вестник РАМН. – 2006. – № 9-10. – С. 56–60.
29. Казначеев, К.С. Механизмы развития цитокининдуцированного апоптоза / К.С. Казначеев // Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44, № 1. – С. 40–43.
30. Калмина, О.А. Значение иммуноморфологических трансформаций в развитии патологии щитовидной железы : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1995. – 33 с.
31. Кандрор, В.И. Механизмы развития болезни Грейвса и действия тиреоидных гормонов / В.И. Кандрор // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2008. – Т. 4, № 1. – С. 26–34.
32. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб: Фолиант, 2008. – 552 с.
33. Колесник, Ю.М. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 / Ю.М. Колесник, М.А. Орловский // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 3–10.
34. Комплексная диагностика узловых форм заболеваний щитовидной железы / Ю.Н. Богин, Н.А. Маневич, Н.А. Шапиро // Клиническая медицина. – 1980. – № 5. – С. 70–74.
35. Комплементзависимая антитиреоидная цитотоксичность сывороток больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / С.И. Крайнова, И.В. Крюкова, Н.А. Мкртумова и др. // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 7–11.
36. Кононенко, И.В. Клинические, иммунологические и генетические особенности медленно прогрессирующего аутоиммунного диабета / И.В. Кононенко, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2003. – № 2. – С. 42–48.
37. Кононенко, И.В. Сахарный диабет 1 типа у взрослых / И.В. Кононенко, О.М. Смирнова // Лечащий врач. – 2005. – № 5. – С. 34–39.
38. Кравец, Е.Б. Об апоптозе лимфоцитов при аутоиммунных тиреопатиях / Е.Б. Кравец, О.И. Уразова, Ю.В. Недосекова, А.В. Рогалева // Проблемы эндокринологии. – 2010. – Т. 56, № 3. – С. 16–20.

- 39.Красных, М.С. Влияние экзогенного тироксина на формирование гуморального и клеточноопосредованного иммунного ответа в период антигензависимого и антигеннезависимого этапов иммуногенеза / М.С. Красных, Б.А. Бахметьев, С.В. Ширшев // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, № 3-5. – С. 234.
- 40.Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Н.Ш. Кремер. – М. : Юнити-Дана, 2004. – 573 с.
- 41.Криволапов, Ю.А. Морфологическая диагностика лимфом / Ю.А. Криволапов, Е.Е. Леенман. – СПб. : Коста, 2006. – 208 с.
- 42.Кулинский, В.И. Биохимические аспекты воспаления / В.И. Кулинский // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 6. – С. 733–746.
- 43.Кулинский, В.И. Молекулярные механизмы действия гормонов. Киназные системы. Системы с внутриклеточными рецепторами. Трансактивация сигнал-трансдукторных систем / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 4. – С. 391–405.
- 44.Лабораторные методы исследования в клинике: справ. / В.В. Меншиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; под ред. В.В. Меншикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
- 45.Лазанович, В.В. Показатели цитокинового статуса, тиреоидных аутоантител и их динамические изменения на фоне лечения болезни Грейвса / В.В. Лазанович, Е.В. Маркелова // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2008. – Т. 4, № 3. – С. 28–35.
- 46.Ланин, Д.В. Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы / Д.В. Ланин, Н.В. Зайцева, О.В. Долгих // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 122–134.
- 47.Лебедев, К.А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К.А. Лебедев. – М. : Медицинская книга, 2003. – 368 с.
- 48.Лебедев, Л.Р. Изучение цитокинового профиля при иммунизации геном интерлейкина-2 человека в составе рекомбинантной плазмиды / Л.Р. Лебедев, Л.Е. Булычев, И.В. Бабин // Иммунология. – 2007. – № 3. – С. 143–147.
- 49.Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика : пер. с англ. / под ред. Дж.Б. Натвига, П. Перлманна, Х. Вигзелля. – М. : Медицина, 1980. – 280 с.
- 50.Макарова, В.И. Роль цитокинов в реализации воспалительной реакции / В.И. Макарова, А.И. Макаров // Экология человека. – 2008. – № 5. – С. 31–35.

51. Малышева, Н.А. Патогенез, диагностика и лечение диабетической ретинопатии у детей, больных сахарным диабетом 1 типа / Н.А. Малышева, Т.Е. Потемина // Медицинский альманах. – 2009. – №4. – С. 171–175.
52. Мельниченко, Г.А. Стандартные подходы к лечению синдромов тиреотоксикоза и гипотиреоза / Г.А. Мельниченко, С.В. Лесникова // Consilium Medicum. Эндокринология. – 2000. – Т. 2, № 5. – С. 14–17.
53. Микроскопическая техника : руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
54. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа / Е.Б. Кравец, Н.В. Рязанцева, Н.М. Яковлева и др. // Сахарный диабет. – 2006. – № 1. – С. 10–14.
55. Недоспасов, С.А. Фактор некроза опухолей и лимфотоксин: молекулярная генетика, регуляция и физиологическая роль / С.А. Недоспасов // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 2. – С. 207–214.
56. Никонова, Т.В. Сахарный диабет 1 типа и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA): клинические, иммуно-генетические и гормонально-метаболические аспекты : автореф. ... д-ра мед. наук / Т.В. Никонова. – М., 2011. – 42 с.
57. Никонова, Т.В. Современные аспекты патогенеза сахарного диабета 1 типа / Т. В. Никонова // Сахарный диабет. – 2006. – № 3. – С. 59–64.
58. Новицкий, В.В. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 4. – С. 36–47.
59. Новое о гистогенезе апудоцитов (открытие или заблуждение) / О.К. Хмельницкий, Б.С. Сережкин, Н.М. Хмельницкая, М.С. Третьякова // Архив патологии. – 1999. – Вып. 2. – С. 61–62.
60. Один, В.И. Иммунопатофизиологические особенности и лабораторная диагностика сахарного диабета тип 1 / В.И. Один, В.Н. Цыган // Клинико-лабораторный консилиум. – 2009. – № 4. – С. 45–53.
61. Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы / В.В. Новиков, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников и др. // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
62. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.

- 63.Парахонский, А.П. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний / А.П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 4. – С. 63–64.
- 64.Петрова, Н.Д. Отдаленные результаты консервативного и оперативного лечения больных диффузным токсическим зобом / Н.Д. Петрова, В.Н. Хомякова, Г.А. Мельниченко // Проблемы эндокринологии. – 2000. – № 6. С. 12–17.
- 65.Пинегин, Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека: пособие для врачей-лаборантов / Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, А.В. Симонова. – М., 2001. – 65 с.
- 66.Популяция антитиреоидных аутоантител как источник антител различных уровней специфичности и функциональности: клиническая значимость феномена комбинаторики при мониторинге пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / А.В. Андреева, Е.Н. Сучкова, С.И. Гаджиева и др. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. 19–27.
- 67.Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–243.
- 68.Продукция некоторых цитокинов у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / Т.В. Глазанова, Л.Н. Бубнова, Е.М. Трунин и др. // Проблемы эндокринологии. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 29–32.
- 69.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. – Алмааты, 2000. – 117 с.
- 70.Райхлин, Н.Т. Онкоциты - система серотониноцитов / Н.Т. Райхлин // Архив патологии. – 1975. – Вып. 2. – С. 12–16.
- 71.Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : Медиа-Сфера, 2002. – 238 с.
- 72.Резаков, Л.П. Морфология, происхождение и возможное значение онкоцитов : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.П. Резаков. – Киев, 1970. – 20 с.
- 73.Репина, Е.А. Механизмы адаптивного иммунитета (на модели сахарного диабета 1 типа) / Е.А. Репина // Сахарный диабет. – 2010. – № 2. – С. 21–27.

74. Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели клеток при различных вариантах течения сахарного диабета 1 типа / И.И. Дедов, Т.В. Никонова, О.М. Смирнова и др. // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 3–7.
75. Рязанцева, Н.В. Молекулярная медицина и вирусные инфекции: современный взгляд на проблему и стратегию взаимоотношений / Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 2. – С. 5–13.
76. Сарвилина, И.В. Междисциплинарные исследования в медицине / И.В. Сарвилина, В.Н. Каркищенко, Ю.В. Горшкова. – М.: Техносфера, 2007. – 112–122 с.
77. Сахарный диабет: метаболические эффекты и окислительный стресс / И.Б. Заводник, И.К. Дремза, Е.А. Лапшина, В.Т. Чещевик // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 2. – С. 83–94.
78. Симбирцев, А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 9–16.
79. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–21.
80. Система фактора некроза опухолей  $\alpha$  и его рецепторов в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций / А.П. Зима, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 357–361.
81. Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты: сб. науч. тр. / под ред. С.В. Сенникова, В.А. Козлова. – Новосибирск, 2004. – 122 с.
82. Смирнова, О.М. Аутоиммунный латентный сахарный диабет у взрослых / О.М. Смирнова, И.В. Кононенко, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 3–7.
83. Содержание различных цитокинов в крови здоровых детей-сибсов, позитивных и негативных по наличию диабетассоциированных аутоантител (GADA, IA-2A, IAA) / В.В. Попова, С.В. Мельниченко, Р.Г. Лукашова и др. // Лік. Справа. Врачеб. Дело. – 2003. – Т. 8. – С. 26–29.
84. Содержание цитокинов в крови в доклиническую и раннюю клиническую стадии развития сахарного диабета у детей / В.В. Попова, С.С. Мельниченко, Т.Н. Малиновская и др. // Проблеми ендокринної патології. – 2004. – Т. 2. – С. 53–59.



85. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека / А.А. Тотолян, И.А. Балдуева, Л.Н. Бубнова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 1. – С. 44–50.
86. Т-лимфоциты – ключевые иммунорегуляторные клетки / В.С. Свиридова, Е.Н. Кологривова, Н.А. Пронина и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 1. – С. 83–88.
87. Фадеев, В.В. Аутоиммунный тиреоидит. Первый шаг к консенсусу / В.В. Фадеев, Г.А. Мельниченко, Г.А. Герасимов // Проблемы эндокринологии. – 2001. – Т. 47, № 4. – С. 7–13.
88. Фадеев, В.В. Болезнь Грейвса / В.В. Фадеев, Г.А. Мельниченко // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 6. – С. 353–356.
89. Фактор некроза опухоли  $\alpha$  и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение / О.А. Кричевская, Н.Г. Клюквина, Е.Н. Александрова и др. // Научно-практическая ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43–46.
90. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : БИНОМ-Пресс, 2006. – 256 с.
91. Фильченков, А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / А.А. Фильченков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 4. – С. 453–466.
92. Хаитов, Р.М. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 4–7.
93. Хаитов, Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов. – М. : ВИНТИ РАН, 2001. – 224 с.
94. Хирургическое лечение диффузного токсического зоба и возможности прогнозирования его результатов / М.И. Балаболкин, П.С. Ветшев, Н.А. Петунина, Л.В. Трухина // Проблемы эндокринологии. – 2000. – № 4. – С. 34–37.
95. Хмельницкий, О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы / О.К. Хмельницкий. – СПб.: Сотис, 2002. – 286 с.
96. Цитокины и противовирусный иммунитет / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, В.В. Белоконь и др. // Успехи физиологических наук. – 2006. – Т. 37, № 4. – С. 34–44.
97. Черствой, Е.Д. Некоторые аспекты иммуногистохимической и молекулярно-биологической характеристики папиллярного рака

- щитовидной железы у детей / Е.Д. Черствой, А.М. Неровня, В.П. Пожарская // Архив патологии. – 1998. – Вып. 2. – С. 8–12.
98. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009. – 752 с.
  99. A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes / H. Borg, A. Gottsater, P. Fernlund, G. Sundkvist // Diabetes. – 2002. – Vol. 51, N 6. – P. 1754–1762.
  100. A CA repeat polymorphism of the IFN- $\gamma$  gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes / M. Jahromi, A. Millward, A. Demaine // J. Interferon Cytokine Research. – 2000. – Vol. 20. – P. 187–190.
  101. A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults / S. Fourlanos, C. Perry, M.S. Stein et al. // Diabetes Care. – 2006. – Vol. 29, N 5. – P. 970–975.
  102. A comparison of childhood and adult type 1 diabetes mellitus / J. Karjalainen, P. Salmela, J. Ilonen et al. // N. Engl. J. Med. – 1989. – Vol. 320, N 14. – P. 881–886.
  103. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon  $\gamma$  secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus / M. Falcone, B. Yeung, L. Tucker et al. // J. Exp. Med. – 1999. – Vol. 190. – P. 963–972.
  104. A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin / D.G. Alleva, P.D. Crowe, L. Jin et al. // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 107, N 2. – P. 173–180.
  105. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells / J.D. Fontenot, J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky // Nat. Immunol. – 2005. – Vol. 6. – P. 1142–1151.
  106. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity / D. Schmidt, J. Verdaguer, N. Averill, P. Santamaria // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 186. – P. 1059–1075.
  107. A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice / X.X. Zheng, A.W. Steele, W.W. Hancock et al. // J. Immunol. – 1997. – Vol. 158. – P. 4507–4513.
  108. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure / P.I. Bullock, P. Laurberg, N. Knudsen et al. // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2005. – Vol. 62, N 6. – P. 713–720.

109. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  gene / V. Pravica, C. Perrey, A. Stevens et al. // *Hum. Immunol.* – 2000. – Vol. 61. – P. 863–866.
110. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes / A.L. Corper, T. Stratmann, V. Apostolopoulos et al. // *Science*. – 2000. – Vol. 288. – P. 505–511.
111. Abnormal T cell autoimmunity against GAD65 in LADA patients / Y. Zhang, Z.G. Zhou, L. Yang et al. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2010. – Vol. 90. – P. 1963–1965.
112. Abnormal T-cell activation caused by imbalance of the IL1/IL1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis / T. Matsuki, S. Nakae, K. Sudo et al. // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 194. – P. 873–881.
113. Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes / D. Faustman, G. Eisenbarth, J. Daley, J. Breitmeyer // *Diabetes*. – 1989. – Vol. 38. – P. 1462–1468.
114. Absence of avidity maturation of autoantibodies to the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 molecule and glutamic acid decarboxylase (GAD65) during progression to type 1 diabetes / A. Westerlund, M. Ankalo, J. Ilonen et al. // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 24, N 2. – P. 153–167.
115. Absolute requirement of macrophages for the development and activation of  $\gamma$ -cell cytotoxic CD8 $^{+}$  T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice / H.-S. Jun, P. Santamaria, H.-W. Lim et al. // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48. – P. 34–42.
116. Achenbach, P. How do we screen for and predict autoimmune diabetes? / P. Achenbach, E. Bonifacio, P.J. Bingley // *Diabetes: Translating research into practice* / ed. C.J. Greenbaum, L.C. Harrison. – New York : Informa Healthcare, 2008. – P. 75–98.
117. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated  $\beta$  cell toxicity / M. Chen, Z.D. Yang, K.M. Zmish et al. // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, N 3. – P. 486–495.
118. Adiponectin levels in people with Latent Autoimmune Diabetes-a case control study [Electronic resource] / S. Brophy, H. Davies, J.W. Stephens et al. // *BMC Research Notes*. – 2010. – Vol. 3. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/3/317>.

119. Advanced glycation end product-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production by peripheral lymphocytes of diabetic patients / T.M. Zhang, Y. Zhang, C.H. Han et al. // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42, suppl. 1. – A. 10.
120. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes / L.C. Harrison, M. Dempsey-Collier, D.R. Kramer, K. Takahashi // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184. – P. 2167–2174.
121. Agardh C. D., Corrado C. M., Lethagen E. [et al.] Clinical evidence for safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes // *J. Diabetes Complications*. – 2005. – Vol. 19, N 4. – P. 238–246.
122. Allison, J. Mechanisms of B-cell death in diabetes: A minor role for CD95 / J. Allison, A. Strasser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 13818–13822.
123. Alpha/beta-T cell receptor (TCR) +CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10 / K.J. Hammond, L.D. Poulton, L.J. Palmisano et al. // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 1047–1056.
124. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency / C. Akesson, K. Uvebrant, C. Oderup et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2010. – Vol. 161. – P. 48–56.
125. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes / P. Hanifi-Moghaddam, N.C. Schloot, S. Kappler et al. // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52, N 5. – P. 1137–1142.
126. Analysis of an IFN- $\gamma$  gene polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects: Danish Study Group of Diabetes in Childhood / F. Pociot, R. Veijola, J. Johannesen et al. // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1997. – Vol. 17. – P. 87–93.
127. Analysis of GAD65 autoantibodies in Stiff-Person syndrome patients / R. Raju, J. Foote, J.P. Banga et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, N 11. – P. 7755–7762.
128. Antibodies to glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) in Chinese IDDM patients / V. Yeung, J.C.N. Chan, C.C. Chow et al. // *15th International Diabetes Federation Congress Proceedings*. – Kobe, 1994. – P. 432.
129. Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of Diabetes mellitus / M.J. Rowley, I.R. Mackay, Q.-Y. Chen et al. // *Diabetes*. – 1992. – Vol. 41. – P. 548–551.
130. Antibodies to islet 37k-antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to insulin-dependent diabetes mellitus in

- endocrine autoimmunity / M.R. Christie, S. Genovese, D. Cassidy et al. // *Diabetes*. – 1994. – Vol. 43. – P. 1254–1259.
131. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset 1 diabetes mellitus / K.C. Herold, W. Hagopian, J.A. Auger et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346, N 22. – P. 1692–1698.
  132. Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor–specified peripheral niche constraints / J. Nishio, M.J. Feuerer, D. Wong et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 1879–1889.
  133. Antioxidative treatment reverses imbalance of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMF activation in diabetic rats / J. Bojuanga, B. Dresar-Mayert, K.-H. Usadel et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 316. – P. 771–780.
  134. Anti-thyroid peroxidase antibody, IA-2 antibody, and fasting C-peptide levels predict beta cell failure in patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA): A 5 year follow-up of the Ehime study / S. Murao, S. Kondo, J. Ohashi et al. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2008. – Vol. 38. – P. 114–121.
  135. Antithyroid peroxidase antibodies in thyroid diseases / S. Mariotti, P. Caturegli, P. Piccolo et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1990. – Vol. 71. – P. 661–669.
  136. Apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes / Y.-H. Kim, S. Kim, K.-A. Kim et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29. – P. 455–465.
  137. Apoptosis regulators bim and fas function concurrently to control autoimmunity and CD8(+) T-cell contraction / A.E. Weant, R.D. Michalek, I.U. Khan et al. // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28. – P. 218–230.
  138. Apoptosis regulators Fas and bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity / P.D. Hughes, G.T. Belz, K.A. Fortner et al. // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28. – P. 197–205.
  139. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction / J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux et al. // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – P. 1–8.
  140. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen / F. Rorsman, E.S. Husebye, O. Winqvist et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92. – P. 8626–8629.
  141. Aspalter, R.M. Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII / R.M. Aspalter, M.M. Eibl, H.M. Wolf // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 74. – P. 572–582.

142. Association between age at diagnosis of Graves' disease and variants in genes involved in immune response [Electronic resource] / B. Jurecka-Lubieniecka, R. Ploski, D. Kula et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 3. – URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0059349>.
143. Association between IA-2 Autoantibody epitope Specificities and Age of Onset in Japanese Patients with Autoimmune Diabetes / E. Kawasaki, Y. Sera, N. Fujita et al. // J. Autoimmun. – 2001. – Vol. 17. – P. 323–331.
144. Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM / S. Genovese, R. Bonfanti, E. Bazzigaluppi et al. // Diabetologia. – 1996. – Vol. 39, N 10. – P. 1223–1226.
145. Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity / A.K. Steck, T.L. Bugawan, A.M. Valdes et al. // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, N 8. – P. 2482–2486.
146. Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but no interleukin 10 - 627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis / S.A. Mitchell, J. Grove, A. Spurkland et al. // Gut. – 2001. – Vol. 49. – P. 288–294.
147. Association of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) polymorphisms with Graves' disease: A meta-analysis / N. Li, Z. Zhou, X. Liu et al. // Clin. Biochem. – 2008. – Vol. 41, N 10-11. – P. 881–886.
148. Associations of GAD65- and IA-2-autoantibodies with genetic risk markers in new-onset IDDM patients and their siblings: The Belgian Diabetes Registry / C.L. Vandewalle, A. Falorni, A. Lernmark et al. // Diabetes Care. – 1997. – Vol. 20, N 10. – P. 1547–1552.
149. Atkinson, M.A. Thirty years of investigating the Autoimmune basis for the type 1 diabetes / M.A. Atkinson // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 1253–1263.
150. Aust, G. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines / G. Aust // Clin. Exp. Immunol. – 1996. – Vol. 105. – P. 148–154.
151. Autoantibodies in diabetes / C. Pihoker, L.K. Gilliam, C.S. Hampe, A. Lernmark // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, suppl. 2. – P. S52–S61.
152. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase / W.A. Hagopian, B. Michelsen, A.E. Karlsen et al. // Diabetes. – 1993. – Vol. 42, N 4. – P. 631–636.

153. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome / M. Solimena, F. Folli, R. Aparisi et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – Vol. 322, N 22. – P. 1555–1560.
154. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and phenotypic features associated with early insulin treatment in individuals with adult-onset diabetes mellitus / A.R. Humphrey, D.J. McCarty, I.R. Mackay et al. // *Diabet Med.* – 1998. – Vol. 15, N 2. – P. 113–119.
155. Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients / N.J. Shervani, S. Takasawa, Y. Uchigata et al. // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 34. – P. 752–758.
156. Autoantibodies to the GLUT-2 glucose transporter of beta cells in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset / L.R. Inman, C.T. McAllister, L. Chen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 1281–1284.
157. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in off spring of parents with type 1 diabetes : The 2-year analysis of the German BABYDIAB study / A.-G. Ziegler, M. Hummel, M. Schenker, E. Bonifacio // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48. – P. 460–468.
158. Autoantibody recognition of COOH-terminal epitopes of GAD65 marks the risk for insulin requirement in adult-onset diabetes mellitus / A. Falorni, G. Gambelunghe, F. Forini et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85, N 1. – P. 309–316.
159. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells / S. You, M. Belghith, S. Cobbold et al. // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 1415–1422.
160. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not **B**-cell exclusive / S. Winer, H. Tsui, A. Lau et al. // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 198–205.
161. Autoimmune polyendocrine failure (Type 1 [insulin-dependent] diabetes mellitus and hypothyroidism) after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with lymphoblastic leukaemia / B. Vialettes, D. Maraninchi, M.P. San Marco et al. // *Diabetologia.* – 1993. – Vol. 36. – P. 541–546.
162. Autoimmune responses in T1DM: quantitative methods to understand onset, progression, and prevention of disease / M. Jaber-Douraki, S.W. Liu, M. Pietropaolo, A. Khadra // *Pediatr. Diabetes.* – 2014. – Vol. 15. – P. 162–174.
163. Autoimmunity and clinical course in children with type 1, type 2 and type 1.5 diabetes / L.K. Gilliam, B.M. Brooks-Worrell, J.P. Palmer et al. // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 25. – P. 244–250.

164. Autoimmunity to the GM2–1 islet ganglioside before and at the onset of type I diabetes / F. Dotta, R. Gianani, M. Previti et al. // *Diabetes*. – 1996. – Vol. 45. – P. 1193–1196.
165. Autoreactive and immunoregulatory T-cell subsets in insulin-dependent diabetes mellitus / L.D. Petersen, M. van der Keur, R.R.P. de Vries, B.O. Roep // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42. – P. 443–449.
166. Autoreactive CD4<sup>+</sup>T cells protect from autoimmune diabetes via bystander suppression using the IL-4/Stat6 pathway / D. Homann, A. Holz, A. Bot et al. // *Immunity*. – 1999. – Vol. 11. – P. 463–472.
167. Autoreactive T cells mediate NK cell degeneration in autoimmune disease / R. Liu, L. Van Kaer, A. La Cava et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 5247–5254.
168. B cell depletion in autoimmune diabetes: insights from murine models / J.L. Chamberlain, K. Attridge, C.J. Wang et al. // *Expert. Opin. Ther. Targets*. – 2011. – Vol. 15. – P. 703–714.
169. B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice / C. Hulbert, B. Riseili, M. Rojas, J.W. Thomas // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 5535–5538.
170. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed-congenic” stock of NOD.Igunull mice / D.V. Serreze, H.D. Chapman, D.S. Varnum et al. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184. – P. 2049–2053.
171. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes / B. Salomon, D.J. Lenschow, L. Rhee et al. // *Immunity*. – 2000. – Vol. 12. – P. 431–440.
172. Banerjee, D. c-Rel-dependent priming of naive T cells by inflammatory cytokines / D. Banerjee, H.C. Liou, R. Sen // *Immunity*. – 2005. – Vol. 23. – P. 445–458.
173. Barsouk, A. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against orbital target cells in thyroid-associated ophthalmopathy and related disorder; close relationship between serum cytotoxic antibodies and parameters of eye muscle dysfunction / A. Barsouk, K.A. Peele, J. Kiljanski // *J. Endocrinol. Invest.* – 1996. – Vol. 19, N 6. – P. 334–341.
174. Bartalena, L. Diagnosis and management of Graves disease: a global overview // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 9, N 12. – P. 724–734.
175. Bayer, A.L. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells / A.L. Bayer, A. Yu, T.R. Malek // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, N 7. – P. 4062–4071.



176. B-cell autoantibodies in children with type 2 diabetes mellitus: subgroup or misclassification? / T. Reinehr, E. Schober, S. Wiegand et al. // *Arch. Dis. Child.* – 2006. – Vol. 91. – P. 473–477.
177. Benlagha, K. CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 Tcells: lymphocytes of innate immunity / K. Benlagha, A. Bendelac // *Semin. Immunol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 537–542.
178. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on B-cells and proinflammatory cytokine expression in islets / W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen, R.C. Bleackley et al. // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48. – P. 21–28.
179. Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice / A. Shimada, B. Charlton, C. Taylor-Edwards, C.G. Fathman // *Diabetes.* – 1996. – Vol. 45. – P. 1063–1067.
180. Beta-cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens / A.A. Kallan, B.O. Roep, S.D. Arden et al. // *J. Autoimmun.* – 1995. – Vol. 8, N 6. – P. 887–899.
181. Beta-cell-cytotoxic CD8+ T cells from nonobese diabetic mice use highly homologous T cell receptor  $\delta$ -chain CDR3 sequences / P. Santamaria, T. Utsugi, B.-J. Park et al. // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154. – P. 2494–2503.
182. Betterle, C. Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? / C. Betterle, F. Lazzarotto, F. Presotto // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 137. – P. 239–250.
183. Bingley, P.J. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation / P.J. Bingley, E. Bonifacio, P.W. Mueller // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52, N 5. – P. 1128–1136.
184. Bingley, P.J. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in prediction risk of progression to IDDM in ICA+ relatives : The ICARUS data set / P.J. Bingley // *Diabetes.* – 1996. – Vol. 45. – P. 1720–1728.
185. Bloomgarden, Z.T. Immunologic Issues in Type 1 Diabetes / Z.T. Bloomgarden // *Diabetes Care.* – 2001. – Vol. 24. – P. 2143–2148.
186. Bloomgarden, Z.T. Inflammation and Insulin Resistance / Z.T. Bloomgarden // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26. – P. 1619–1623.
187. Blotta, M.H. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes / M.H. Blotta, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – P. 5589–5595.

188. Bretz, J.D. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? / J.D. Bretz, J.R. Baker // *Clin. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 55, N 1. – P. 1–11.
189. Brooking H., Ananieva-Jordanova R., Arnold C. [et al.] A sensitive non-isotopic assay for GAD65 autoantibodies // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 331, N 1-2. – P. 55–59.
190. Brooks-Worrell, B.M. Latent autoimmune diabetes in adults / B.M. Brooks-Worrell, J.P. Palmer // *Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects* / ed. G.S. Eisenbarth. – New York: Humana Press, c/o Springer Science + Business Media, LLC, 2011. – P. 315–329.
191. Brophy, S. Study protocol: Randomized, controlled, parallel-group prospective study to investigate the clinical effectiveness of early insulin treatment in patients with latent autoimmune diabetes in adults [Electronic resource] / S. Brophy, H. Davies, S. Bain // *BMC Endocrine Disorders.* – 2008. – Vol. 8. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6823/8/8>.
192. Bruun, C. Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells / C. Bruun, P.E. Heding, S.G. Ronn // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2009. – Vol. 13. – P.32–38.
193. Bu, D.F. The exon-intron organization of the genes (GAD1 and GAD2) encoding two human glutamate decarboxylases (GAD67 and GAD65) suggests that they derive from a common ancestral GAD / D.F. Bu, A.J. Tobin // *Genomics.* – 1994. – Vol. 21, N 1. – P. 222–228.
194. Buckner, J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+regulatory T cells in human autoimmune diseases / J.H. Buckner // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 849–859.
195. Buschard, K. Activated CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in newly diagnosed type 1 diabetes: a prospective study / K. Buschard, P. Damsbo, C. Ropke // *Diabet. Med.* – 1990. – Vol. 7. – P. 132–136.
196. Campbell, I.L. Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells / I.L. Campbell, G.H. Wong, J.W. Schrader et al. // *Diabetes.* – 1985. – Vol. 34. – P. 1205–1210.
197. Cappa, M. Autoimmune thyroid diseases in children [Electronic resource] / M. Cappa, C. Bizzarri, F. Crea // *J. Thyroid Res.* – 2011. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/jtr/2011/675703/>
198. Caputo, M. HLA DQB1 genotyping in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) / M. Caputo, G.E. Cerrone, A.P. Lopez // *Medicina (B Aires).* – 2005. – Vol. 65, N 3. – P. 235–240.

199. Carayanniotis, G. Pathogenic thyroglobulin peptides as model antigens: insights on the induction and maintenance of autoimmune thyroiditis / G. Carayanniotis, Y.C. Kong // *Int. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 19, N 6. – P. 557–572.
200. Caspase activation is required for T-cell proliferation / N.J. Kennedy, T. Kataoka, J. Tschopp et al. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – P. 1891–1896.
201. Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine / A.G. Gabibov, N.A. Ponomarenko, E.B. Tretyak et al. // *Autoimmun. Rev.* – 2006. – Vol. 5. – P. 324–330.
202. Caturegli, P. Now, who was he? / P. Caturegli, K. Hurthle. // *Thyroid.* – 2005. – Vol. 15, N 2. – P. 121–123.
203. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells / W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-Yu et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1701–1711.
204. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping GAD65 protein epitopes. Implications for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility / D. Ou, L.A. Jonsen, D.L. Metzger, A.J. Tingle // *Hum. Immunol.* – 1999. – Vol. 60, N 8. – P. 652–664.
205. CD4<sup>+</sup> T-cell help controls CD8<sup>+</sup> T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death / E.M. Janssen, N.M. Droin, E.E. Lemmens et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – P. 88–93.
206. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion / A.E. Herman, G.J. Freeman, D. Mathis, C. Benoist // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 199. – P. 1479–1489.
207. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in human autoimmune diabetes / A.L. Putnam, F. Vendrame, F. Dotta, P.A. Gottlieb // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 24. – P. 55–62.
208. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells / F.S. Wong, I. Visintin, L. Wen et al. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 67–76.
209. CD95 and CD95-ligand expression in endocrine pancreas of NOD, NOR and BALB/c mice / A. Signore, A. Annovazzi, E. Procaccini et al. // *Diabetologia.* – 1997. – Vol. 40. – P. 1476–1479.
210. Cellular and humoral autoimmunity markers in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with secondary drug failure / A.V. Zavala, L.E. Fabiano de Bruno, A.I. Cardoso et al. // *Diabetologia.* – 1992. – Vol. 35. – P. 1159–1164.

211. Cernea, S. B-cell protection and therapy for latent autoimmune diabetes in adults / S. Cernea, R. Buzzetti, P. Pozzilli // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32, suppl. 2. – S. 246–252.
212. Chan, F.K. The pre-ligand binding assemble domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function / F.K. Chan // *Ann. Rheum. Dis*. – 2000. – Vol. 59. – P. 150–153.
213. Changing phenotypes of IDDM. Is it type 1 or type 2? / D.J. Becker, I. Libman, M. Pietropaolo et al. // *Pediatr. Res*. – 2001. – Vol. 49. – P. 93A.
214. Characterization of insulin autoantibodies in relatives of patients with type I diabetes / L. Castano, A.G. Ziegler, R. Ziegler et al. // *Diabetes*. – 1993. – Vol. 42, N 8. – P. 1202–1209.
215. Chatenoud, L. CD3 antibody treatment stimulates the functional capability of regulatory T cells // *Generation and effector functions of regulatory lymphocytes (Novartis Foundation Symposium 252)* / eds. G. Bock, J. Goode. – Chichester : Wiley, 2003. – P. 279–290.
216. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes / K. Seino, K. Iwabuchi, N. Kayagaki et al. // *J. Immunol*. – 1998. – Vol. 161. – P. 4484–4488.
217. Chen, M. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity / M. Chen, Z.D. Yang, K.M. Zmish // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48. – P. 486–495.
218. Christie, M.R. Islet Proteins Implicated in Pathogenesis of Type I Diabetes Mellitus // *The Biology of the Pancreatic B-Cell* / ed. S.L. Howell. Stanford : JAI Press Inc., 1999. – P. 75–100.
219. Chronic complications in adult patients with newly diagnosed diabetes mellitus in relation to the presence of humoral autoimmune markers against pancreatic islet cells / B. Szepietowska, M. Szelachowska, M. Gorska et al. // *Pol Arch Med Wewn*. – 2004. – Vol. 111, N 5. – P. 563–569.
220. Circadian variation in urinary excretion of TNF $\alpha$ -soluble receptor 1 and TNF $\alpha$ -soluble receptor 2 in type 1 diabetes mellitus / M. Klementova, P. Wohl, E. Krusinova et al. // *Diabetologia*. – 2004. – Vol. 47, suppl. 1. – A. 461.
221. Clark, O.H. Thyreotropin receptor-adenilat cyclase system in Hurtle cell neoplasms / O.H. Clark, P.L. Gerend // *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. – 1985. – Vol. 61. – P. 773–778.
222. Class III alleles of the variable number of tandem repeat insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes / P. Vafiadis, H. Ounissi-Benkhalha, M. Palumbo et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. – 2001. – Vol. 86, N 8. – P. 3705–3710.

223. Classifying diabetes according to the new WHO clinical stages / E. Lindholm, E. Agardh, T. Tuomi et al. // *Eur. J. Epidemiol.* – 2001. – Vol. 17, N 11. – P. 983–989.
224. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies / T. Tuomi, E.L. Carlsson, H. Li et al. // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48. – P. 150–157.
225. Clinical, immunological, and genetic heterogeneity of diabetes in an Italian population-based cohort of lean newly diagnosed patients aged 30–54 years / G. Bruno, A. de Salvia, R. Arcari et al. // *Diabetes Care.* – 1999. – Vol. 22. – P. 50–55.
226. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens / D.U. Rabin, S.M. Pleasic, R. Palmer-Crocker, J.A. Shapiro // *Diabetes.* – 1992. – Vol. 41, N 2. – P. 183–186.
227. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10 / A.E. Karlsen, W.A. Hagopian, C.E. Grubin et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, N 19. – P. 8337–8341.
228. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives / P.J. Bingley, M.R. Christie, E. Bonifacio et al. // *Diabetes.* – 1994. – Vol. 43. – P. 1304–1310.
229. Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice: analysis of cytokine mRNA expression in the graft / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen et al. // *Transplantation.* – 1995. – Vol. 60. – P. 368–374.
230. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop / C.F. Verge, D. Stenger, E. Bonifacio et al. // *Diabetes.* – 1998. – Vol. 47, N 12. P. 1857–1866.
231. Comparison of cytokine ELISpot assay formats for the detection of islet antigen autoreactive T cells : Report of the third immunology of diabetes society T-cell workshop / N.C. Schloot, G. Meierhoff, M. Karlsson Faresjo et al. // *J. Autoimmun.* – 2003. – Vol. 21, N 4. – P. 365–376.
232. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus / S. Doganay, C. Evereklioglu, H. Er et al. // *Eye.* – 2002. – Vol. 16, N 2. – P. 163–170.

233. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling; internalized TNF receptosomes as death vesicles / W. Schneider-Brachert, V. Tchikov, J. Neumeyer et al. // *J. Immunity*. – 2004. – Vol. 21, N 3. – P. 415–428.
234. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF therapy / M.R. Ehrenstein, J.G. Evans, A. Singh et al. // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 200, N 3. – P. 277–285.
235. Contrasting cellular and humoral autoimmunity associated with latent autoimmune diabetes in adults / A. Mayer, N. Fabien, M.C. Gutowski et al. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 157. – P. 53–61.
236. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine / I. Mascanfroni, M. Montesinos, S. Susperreguy et al. // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – P.1032–1042.
237. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity / P. Schneider, N. Holler, J.L. Bodmer et al. // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 1205–1213.
238. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA) / A. Tsiavou, E. Hatziagelaki, A. Chaidaroglou et al. // *Cytokine*. – 2005. – Vol. 31, N 2. – P. 135–141.
239. C-peptid induces human renal mesangial cell proliferation in vitro, activating Src-kinase, PI-3 kinase and ERK1/2 / D. Vasic, A. Spyralis, R. Durst et al. // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2012. – Vol. 351. – P. 337–341.
240. C-peptide increases Na, K-ATPase expression via PKC- and MAP kinase-dependent activation of transcription factor ZEB in human renal tubular cells / D. Galuska, S. Pirkmajer, R. Barres et al. // *Pol. One*. – 2011. – Vol. 6, N 12. – e28294.
241. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function : report of an ADA workshop / J.P. Palmer, G.A. Fleming, C.J. Greenbaum et al. // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – P. 250–264.
242. Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time : Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes / D.R. Laybutt, M. Glandt, G. Xu et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 2997–3005.

243. CTLA-4 gene polymorphism contributes to the genetic risk for latent autoimmune diabetes in adults / A. Cosentino, G. Gambelunghe, C. Tortoioli et al. // *Ann NY Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 958. – P. 337–340.
244. CTLA-4 Ig (Abatacept) in Recent Onset Diabetes [Electronic resource] / Type 1 Diabetes TrialNet. – URL: <http://www.diabetestrialnet.org/CTLA4/index.htm>
245. Culina, S. Pathogenic and regulatory T cells in type 1 diabetes: losing self-control, restoring it, and how to take the temperature / S. Culina, R. Mallone // *Curr Diab Rep.* – 2011. – Vol. 11. – P. 426–433.
246. Cutting edge: In contrast to effector T cells CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95L-but not to TCR-mediated cell death / B. Fritzsching, N. Oberle, N. Eberhardt et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 32–36.
247. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: association of 1 year of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion / The Canadian-European Randomized Control Trial Group // *Diabetes.* – 1988. – Vol. 37. – P. 1574–1582.
248. Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of Th1 cytokines correlates with beta-cell destructive insulinitis and IDDM / A. Rabinovitch, W. Suarez-Pinzon, A. El-Sheikh et al. // *Diabetes.* – 1996. – Vol. 45. – P. 749–754.
249. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM / M.J. Hussain, J. Maher, T. Warnock et al. // *Diabetologia.* – 1998. – Vol. 41, N 3. – P. 343–349.
250. Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells / F. Ortis, N. Naamane, D. Flamez et al. // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, N 2. – P. 358–374.
251. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 heterozygous codon 49 A/G dimorphism is associated to latent autoimmune diabetes in adults (LADA) / M. Caputo, G.E. Cerrone, A.P. Lopez et al. // *Autoimmunity.* – 2005. – Vol. 38, N 4. – P. 277–281.
252. Cytotoxicity of CD56 (bright) NK cells is towards autologous activated CD4 T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A [ Electronic resource] / N. Nielsen, N. Odum, B. Urso et al. // *PLoS One.* –2012. – Vol. 7, N 2. – URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031959>

253. D'Cruz, L.M. Development and function of agonist-induced CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling / L. D'Cruz, L. Klein // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1152–1159.
254. Dalberg, U. Both Gmap5 and the diabetogenic BBDP allele of Gimap5 induce apoptosis in T cells / U. Dalberg, H. Markholst, L. Hornum // *Int. immunol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 447–453.
255. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes / A. Gonzalez, I. Andre-Schmutz, C. Carnaud et al. // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 1117–1125.
256. Daniel, D. Protection of non-obese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23) / D. Daniel, D.R. Wegmann // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 956–960.
257. Death Receptor Signaling and Its Function in the Immune System / S.C. Fas, B. Fritzsche, E. Suri-Payer, P.H. Krammer // *Apoptosis and Its Relevance to Autoimmunity* / ed. K.B. Elkon. – Basel : Karger, 2006. – P. 1–17.
258. Decker, T. Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins / T. Decker, P. Kovarik // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol. 55. – P. 1535–1546.
259. Decrease of fructosamine levels during treatment with adalimumab in patients with both diabetes and rheumatoid arthritis / I.C. Eijk, M.J.L. Peters, M.T. Nurmohamed et al. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 156. – P. 291–293.
260. Decreased IL-4 production in new onset Type I insulindependent diabetes mellitus / M.A. Berman, C.I. Sandborg, Z. Wang et al. // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 4690–4696.
261. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus / M.J. Rapoport, A. Mor, P. Vardi et al. // *J. Autoimmun.* – 1998. – Vol. 11, N 6. – P. 635–642.
262. Decreasing TNFa results in less fibrosis and earlier resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis / K. Chen, Y. Wei, G.C. Sharp et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 306–314.
263. Defective regulation of IFN-gamma and IL-12 by and endogenous IL-10 in progressive multiple sclerosis / K.E. Balashov, M. Comabella, T. Ohashi et al. // *Neurology.* – 2000. – Vol. 55. – P. 192–198.



264. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes / S. Lindley, C.M. Dayan, A. Bishop et al. // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 92–99.
265. Defective suppressor function of human regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II / M.A. Kriegel, T. Lohmann, C. Gabler et al. // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 199, N 9. – P. 1285–1291.
266. Defects in differentiation of bone-marrow derived dendritic cells of the BB rat are partly associated with IDDM2 (the lyp gene) and partly associated with other genes in the BB rat background / V. Sommandas, E.A. Rutledge, B. van Yserloo et al. // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 25. – P. 46–56.
267. Dendritic cells are targets for human invariant V alpha 24+ natural killer T cell cytotoxic activity: an important immune regulatory function / A. Nicol, M. Nieda, Y. Koezuka et al. // *Exp. Hematol.* – 2000. – Vol. 28. – P. 276–282.
268. Detection of autoreactive T cells in type 1 diabetes using coded autoantigens and an immunoglobulin-free cytokine ELISPOT assay : Report from the fourth immunology of diabetes society T cell workshop / M. Nagata, R. Kotani, H. Moriyama et al. // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1037. – P. 10–15.
269. Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects / H. Reijonen, E.J. Novak, S. Kochik et al. // *Diabetes*. – 2002. – Vol. 51, N 5. – P. 1375–1382.
270. Deutekom, A.W. van The islet autoantibody titers their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus / A.W. van Deutekom, R.J. Heine, S. Simsek // *Diabetic Medicine*. – 2008. – Vol. 25. – P. 117–125.
271. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny / J.D. Fontenot, J.L. Dooley, A.G. Farr, A.Y. Rudensky // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P. 901–906.
272. Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes / S. Trembleau, G. Penna, S. Gregori et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – P. 2330–2239.
273. Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus // *N. Eng. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – P. 977–986.

274. Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus // *N. Eng. J. Med.* – 2002. – Vol. 346, N 22. – P. 1685–1691.
275. Diamond, A. Biphasic roles for IFN $\gamma$  in islet allograft immunity and tolerance / A. Diamond, R.G. Gill // *Transplantation.* – 1999. – Vol. 67. – P. S23.
276. Differences in the genetic background of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 1 diabetes mellitus / A. Vatay, K. Rajczyk, E. Pozsonyi et al. // *Immunol. Lett.* – 2002. – Vol. 84, N 2. – P. 109–115.
277. Different Th1/Th2 cytokine expression in type 1 diabetes mellitus patients (T1DM) alone or associated with autoimmune thyroid disease (AITD) / R. Citarrella, P. Richiusa, A. Mattina et al. // *Diabetologia.* – 2004. – Vol. 47, suppl. 1. – A. 188.
278. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death / A.S. Varadhachary, S.M. Perrow, C. Hu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 5778–5783.
279. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death / F. Ramsdell, M.S. Seaman, R.E. Miller et al. // *Int. Immunol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 1545–1553.
280. Differential diagnosis of oncocytic lesions of the breast and thyroid utilizing / J. Nasuti, C. Benedict, M. Hurford et al. // *J Acta Cytol.* – 1999. – Vol. 43, N 4. – P. 544–555.
281. Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat and mouse pancreatic islets / J. Kim, W. Richter, H.J. Aanstoot et al. // *Diabetes.* – 1993. – Vol. 42. – P. 1799–1808.
282. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro / S. Poncin, B. Lengele, I.M. Colin, A.-C. Gerard // *Endocrinology.* – 2008. – Vol. 149, N 4. – P. 1534–1542.
283. Diminished IFN- $\gamma$  response to diabetes-associated autoantigens in children at diagnosis and during follow up of type 1 diabetes / M. Karlsson Faresjo, O. Vaarala, S. Thuswaldner et al. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2006. – Vol. 22, N 6. – P. 462–470.
284. Disabling an integral CTL epitope allows suppression of autoimmune diabetes by intranasal proinsulin peptide / N.R. Martinez, P. Augstein, A.K. Moustakas et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111. – P. 1365–1371.

285. Distinct Diagnostic Criteria of Fulminant Type 1 Diabetes Based on Serum C Peptide Response and HbA1c Levels at Onset / S. Tanaka, T. Endo, K. Aida et al. // *Diabetes Care*. – 2004. – Vol. 27, N 8. – P. 1936–1941
286. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function / K. Maedler, G.A. Spinas, D. Dyntar et al. // *Diabetes*. – 2001. – Vol. 50. – P. 69–76.
287. Distinctive interactions in the holoenzyme formation for two isoforms of glutamate decarboxylase / C.H. Chen, G. Battaglioli, D.L. Martin et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – Vol. 1645, N 1. – P. 63–71.
288. Dominant TCR  $\delta$ -chain clonotypes and interferon- $\gamma$  are expressed in the pancreas of patients with recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus / K. Yamagata, H. Nakajima, K. Tomita et al. // *Diabetes. Res. Clin. Pract.* – 1996. – Vol. 34. – P. 37–46.
289. Donath, M.Y. Mechanisms of Beta-Cell Death in Diabetes / M.Y. Donath, J.A. Ehses // *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* / eds. S. Seino, G.I. Bell. – Japan : Springer, 2008. – P. 75–89.
290. Dose-effect Relationship of Low-dose IL-2 in Type 1 Diabetes (DF-IL2) [Electronic resource]. – URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01353833>.
291. Douglas, C. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function / C. Douglas, N.P. Palmerand, V. Restifo // *Trends. Immunol.* – 2009. – Vol. 30. – P. 592–602.
292. Downregulation of Fas ligand by shedding / M. Tanaka, T. Itai, M. Adachi et al. // *Nat. Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 31–36.
293. Dupre, J. Glycaemic effects of incretins in type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans / J. Dupre // *Regul. Pept.* – 2005. – Vol. 128. – P. 149–157.
294. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development / S. Gregori, N. Giarratana, S. Smiroldo, L. Adorini // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 4040–4047.
295. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes/ H.E. Naserke, A.-G. Ziegler, V. Lampasona, E. Bonifacio // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 6963–6969.
296. Effect of exenatide on beta cell function after islet transplantation in type 1 diabetes / K.A. Ghofaili, M. Fung, Z. Ao et al. // *Transplantation*. – 2007. – Vol. 83. – P. 24–28.
297. Effect of interferon-gamma and glucose on major histocompatibility complex class I and class II expression by pancreatic beta- and non-beta-cells /

- D. Pavlovic, M. van de Winkel, B. van der Auwera et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1997. – Vol. 82, N 7. – P. 2329–2336.
298. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial-Type 1 / J.S. Skyler, J.P. Krischer, J. Wolfsdorf et al. // *Diabetes Care.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1068–1076.
299. Effects of T3R alpha 1 and T3R alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development / C. Arpin, M. Pihlgren, A. Fraichard et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, N 1. – P. 152–160.
300. Eisenbarth, G.S. Autoimmune polyendocrine syndromes / G.S. Eisenbarth, Gottlieb P.A. // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – P. 2068–2079.
301. Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes mellitus // *Joslin's diabetes mellitus* / eds. C.R. Kahn, G.C. Weir, G.L. King et al. – 14 th ed. – Boston : Joslin diabetes center, 2005. – P. 173–198.
302. Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: news perspectives on disease pathogenesis and treatment / G.S. Eisenbarth, M.A. Atkinson // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 221–229.
303. Eizirik, D.L. B-Cell Dysfunction and Death / D.L. Eizirik, A. Hoorens // *The Biology of the Pancreatic B-Cell* / ed. S.L. Howell. – Stanford : JAI Press Inc., 1999. – Vol. 29. – P. 47–73.
304. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM / M.J. Hussain, M. Peakman, H. Gallati et al. // *Diabetologia.* – 1996. – Vol. 39, N 1. – P. 60–69.
305. Elewaut, D. Molecular biology of NKT cell specificity and development / D. Elewaut, M. Kronenberg // *Semin. Immunol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 561–568.
306. Endothelial Perturbation in Children and Adolescents With Type 1 Diabetes / M. Romano, M. Pomilio, S. Vigneri et al. // *Diabetes Care.* – 2001. – Vol. 24. – P. 1674–1678.
307. Epitopes on thyroglobulin: a study of patients with thyroid disease / P. Caturegli, S. Mariotti, R.C. Kupperts et al. // *Autoimmunity.* – 1994. – Vol. 18. – P. 41–49.
308. EURODIAB ACE Study Group: Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe // *Lancet.* – 2000. – Vol. 355. – P. 873–876.
309. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes / E.A. Gale, P.J. Bingley, C.L. Emmett, T. Collier // *Lancet.* – 2004. – Vol. 363. – P. 925–931

310. Evaluation of a Diabetes Vaccine in Newly Diagnosed Diabetics [Electronic resource] // Immune Tolerance Network. – URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00057499>.
311. Evidence of circulating interferon-gamma in newly diagnosed diabetic children / P.A. Tovo, F. Cerutti, E. Palomba et al. // *Acta Paediatr.Scand.* – 1984. – Vol. 73, N 6. – P. 785–788.
312. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope / S.C. Kent, Y. Chen, L. Bregoli et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 435, N 7039. – P. 224–228.
313. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults: executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) (Adult treatment panel ATP III) // *JAMA.* – 2001. – Vol. 285. – P. 2486–2497.
314. Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human  $\beta$ -cells sorted by flow-cytometry and cultured in vitro / G. Stassi, M. Todaro, P. Richiusa et al. // *Transplant. Proc.* – 1995. – Vol. 27. – P. 3271–3275.
315. Expression of Immunoregulatory Molecules by Thyrocytes Protects Nonobese Diabetic-H2h4 Mice from Developing Autoimmune Thyroiditis / M. Nakahara, Y. Nagayama, O. Saitoh et al. // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150. – P. 1545–1551.
316. Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: Retention and enhancement of cytotoxicity / K. Aoki, M. Kurooka, J.J. Chen et al. // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 333–337.
317. Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha$ 624J $\beta$ 6Q T cells in type 1 diabetes / S.B. Wilson, S.C. Kent, K.T. Patton et al. // *Nature.* – 1998. – Vol. 391. – P. 177–181.
318. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine / P.F. Bougneres, J.C. Carel, L. Castano et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 318. – P. 663–670.
319. Falorni, A. Immunologic and genetic aspects of latent autoimmune diabetes in the adult / A. Falorli // *Minerva Endocrinol.* – 2003. – Vol. 28, N 4. – P. 297–312.
320. Fang, Y. Cultured Murine Thyroid Epithelial Cells Expressing Transgenic Fas-Associated Death Domain-Like Interleukin-1-Converting Enzyme Inhibitory Protein Are Protected from Fas-Mediated Apoptosis / Y. Fang, H. Braley-Mullen // *Endocrinology.* – 2008. – Vol. 48. – P. 3321–3329.

321. Fang, Y. Interleukin-10 Promotes Resolution of Granulomatous Experimental Autoimmune Thyroiditis / Y. Fang, G.C. Sharp, H. Braley-Mullen // *Am. J. Pathol.* – 2008. – Vol. 172, N 6. – P. 1591–1602.
322. Farid, N.R. Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor / N.R. Farid, M.W. Szkudlinski // *Endocrinology.* – 2004. – 145. – P. 4048–4057.
323. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type I diabetes mellitus / M. Moriwaki, N. Itoh, J. Miyagawa et al. // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42. – P. 1332–1340.
324. Fas ligand expression in islets of langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction / S.M. Kang, D.B. Schneider, Z. Lin et al. // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3. – P. 738–743.
325. Fine mapping of diabetes-associated IA-2 specific autoantibodies / M. Bearzatto, V. Lampasona, C. Belloni, E. Bonifacio // *J. Autoimmun.* – 2003. – Vol. 21, N 4. – P. 377–382.
326. First-phase insulin response in young healthy children at genetic and immunological risk for Type I diabetes / P. Keskinen, S. Korhonen, A. Kupila et al. // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45, N 12. – P. 1639–1648.
327. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication / K. Maedler, A. Fontana, F. Ris et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 8236–8241.
328. For the Non-Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group : High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes / R. Buzzetti, S. di Pietro, A. Giaccari et al. // *Diabetes Care.* – 2007. – Vol. 30. – P. 932–938.
329. Fort, M.M. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis / M.M. Fort, M.W. Leach, D.M. Rennick // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 3256–3261.
330. Foulis, A.K. Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man: Macrophages, lymphocytes, and interferon- $\gamma$  containing cells / A.K. Fouli, M. McGill, M.A. Farquharson // *J. Pathol.* – 1991. – Vol. 165. – P. 97–103.
331. Fox, C.J. IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulitis in nonobese diabetic mice / C.J. Fox, J.S. Danska // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – P. 2414–2424.
332. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+CD25+T-cells in type 1 diabetes / T.M. Brusko, C.H. Wasserfall, M. Clare-Salzler et al. // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 1407–1414.

333. GABA and pancreatic  $\beta$ -cells: Colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion / A. Reetz, M. Solimena, M. Matteoli et al. // *EMBO J.* – 1991. – Vol. 10. – P. 1275–1284.
334. GAD antibodies in NIDDM: ten-year follow-up from the diagnosis / L.K. Niskanen, T. Tuomi, J. Karjaainen et al. // *Diabetes Care.* – 1995. – Vol. 18. – P. 1557–1565.
335. GAD autoantibodies and epitope reactivities persist after diagnosis in latent autoimmune diabetes in adults but do not predict disease progression: UKPDS 77 / M. Desai, C.A. Cull, V.A. Horton et al. // *Diabetologia.* – 2007. – Vol. 50. – P. 2052–2060.
336. GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects / V. Oling, J. Marttila, J. Ilonen et al. // *J. Autoimmun.* – 2005. – Vol. 25, N 3. – P. 235–243.
337. GAD65 antibody epitope patterns of type 1.5 diabetes patients are consistent with slow onset autoimmune diabetes / C.S. Hampe, I. Kockum, M. Landin-Olsson et al. // *Diabetes Care.* – 2002. – Vol. 25. – P. 1481–1482.
338. GAD65 Autoantibody Responses in Japanese Latent Autoimmune Diabetes in Adult Patients / T. Maruyama, S. Oak, A. Shimada, C.S. Hampe // *Diabetes Care.* – 2008. – Vol. 31. – P. 1602–1607.
339. GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65 / H. Reijonen, T.L. Daniels, A. Lernmark, G.T. Nepom // *Diabetes.* – 2000. – Vol. 49, N 10. – P. 1621–1626.
340. Genetic dissection reveals diabetes loci proximal to the gimap5 lymphopenia gene / J.M. Fuller, M. Bogdani, T.D. Tupling et al. // *Physiol Genomics.* – 2009. – Vol. 38. – P. 89–97.
341. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes / J. Graham, W.A. Hagopian, I. Kockum et al. // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51, N 5. – P. 1346–1355.
342. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes / C. Cervin, V. Lyssenko, E. Bakhtadze et al. // *Diabetes.* – 2008. – Vol. 57. – P. 1433–1437.
343. Genetically determined lymphopenia and autoimmune manifestations / A. Villa, V. Marrella, F. Rucci, L.D. Notarangelo // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, N 3. – P. 318–324.

344. Genetics of latent autoimmune diabetes in adults / C.B. Sanjeevi, G. Gambelunghe, A. Falorni et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 958. – P. 107–111.
345. Gepts, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus // W. Gepts // *Diabetes.* – 1965. – Vol. 14. – P. 619–633.
346. Gianoukakis, A.G. Cytokines, Graves' Disease, and Thyroid-Associated Ophthalmopathy / A.G. Gianoukakis, N. Khadavi, T.J. Smith // *Thyroid.* – 2008. – Vol. 18, N 9. – P. 953–958.
347. Global Prevalence of Diabetes / S. Wild, G. Roglic, A. Green et al. // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27, N 5. – P. 1047–1053.
348. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets / K. Maedler, G.A. Spinas, R. Lehmann et al. // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 1683–1690.
349. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells / A. Wendt, B. Birnir, K. Buschard et al. // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, N 4. – P. 1038–1045.
350. Glucose inhibits GABA release by pancreatic beta-cells through an increase in GABA shunt activity / C. Wang, K. Kerckhofs, M. van de Casteele et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 290, N 3. – P. E494–499.
351. Glucose modulates gamma-amino butyric acid release from the pancreatic beta TC6 line / R. Gaskins, M. Baldeon, L. Selassie, L. Beverly // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 270. – P. 30286–30289.
352. Glucose-induced beta-cell production of interleukin-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets / K. Maedler, P. Sergeev, F. Ris et al. // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 851–860.
353. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA<sub>A</sub>-receptor chloride channels / P. Rorsman, P.O. Berggren, K. Bokvist et al. // *Nature.* – 1989. – Vol. 341, N 6239. – P. 233–236.
354. Glutamate decarboxylase (GAD65) and tyrosine phosphatase-like protein (IA-2) autoantibodies index in a regional population is related to glucose intolerance and body mass index / O. Rolandsson, E. Hagg, C. Hampe et al. // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42, N 5. – P. 555–559.
355. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children / W.A. Hagopian, C.B. Sanjeevi, I. Kockum et al. // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95, N 4. – P. 1505–1511.
356. Gottlieb, P.A. Human Autoimmune Diabetes / P.A. Gottlieb, G.S. Eisenbarth // *The Molecular Pathology of Autoimmune Diseases* / eds. A.N.



- Theofilopoulos, C.A. Bona. – 2nd ed. – London, New York: Taylor & Francis, 2002. – P. 948–987.
357. Graves' disease and gene polymorphism of TNF- $\delta$ , IL-2, IL-6, IL-12, and IFN- $\gamma$  / M. Anvari, O. Khalilzadeh, A. Esteghamati et al. // *Endocrine*. – 2010. – Vol. 37, N 2. – P. 344–348.
  358. Graves' ophthalmopathy: a review of immunogenetics / O. Khalilzadeh, S. Noshad, A. Rashidi, A. Amirzargar // *Curr. Genomics*. – 2011. – Vol. 12, N 8. – P. 564–575.
  359. Green, D.R. Fas Bim Boom / D.R. Green // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28. – P. 141–143.
  360. Green, E.A. The initiation of autoimmune diabetes / E.A. Green, R.A. Flavell // *Curr. Opin. Immunol.* – 1999. – Vol. 11. – P. 663–669.
  361. Greenbaum, C.J. Fifth International Serum Exchange Workshop for Insulin Autoantibody (IAA) Standardization: The Immunology and Diabetes Workshops and participating laboratories / C.J. Greenbaum, T.J. Wilkin, J.P. Palmer // *Diabetologia*. – 1992. Vol. 35, N 8. – P. 798–800.
  362. Greenbaum, C.J. What are the prospects for preventing autoimmune diabetes? / C.J. Greenbaum, L.C. Harrison // *Diabetes: Translating research into practice* / eds. C.J. Greenbaum, L.C. Harrison. – New York : Informa Healthcare, 2008. – P. 99–122.
  363. Groop, L. Islet cell antibodies identify latent tipe 1 diabetes in patient aged 35-75 years at diagnosis / L. Groop, G.F. Bottazzo, D. Doniach // *Diabetes*. – 1986. – Vol. 35. – P. 237–241.
  364. Hajeer, A.H. Influence of TNF  $\delta$  gene polymorphisms on TNF $\delta$  production and disease / A.H. Hajeer, I.V. Hutchinson // *Hum. Immunol.* – 2001. – Vol. 62. – P. 1191–1199.
  365. Hanninen, A. Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model / A. Hanninen, L.C. Harrison // *Immunological Rev.* – 2000. – Vol. 173. – P. 109–119.
  366. Harber, M. The role of cytokines in immunological tolerance : potential for therapy / M. Harber, A. Sundstedt, D. Wraith // *Exp. Rev. Mol. Med.* – 2000. – Vol. 2. – P. 1–20.
  367. Harrison, L.C. (Pro) insulin-specific regulatory T cells / L.C. Harrison, N.R. Solly, N.R. Martinez // *Generation and effector functions of regulatory lymphocytes (Novartis Foundation Symposium 252)* / eds. G. Bock, J. Goode. – Chichester: Wiley, 2003. – P. 132–145.
  368. Hawa, M.I. GAD antigen and its significance in type I diabetes / M.I. Hawa, R.D. Leslie // *J. Endocrinol. Invest.* – 2002. – Vol. 25, N 7. – P. 576.

369. Heritability analysis of IgG4 antibodies in autoimmune thyroid disease / I.M. Outschoorn, M.V. Talor et al. // *Autoimmunity*. – 2014. – Vol. 47. – P. 320–326.
370. Herold, K.C. Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3 gamma1 (Ala-Ala) / K.C. Herold, J.B. Burton, F. Francois // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111. – P. 409–418.
371. Herrera, P.L. A mouse CD8 T cell-mediated acute autoimmune diabetes independent of the perforin and Fas cytotoxic pathways: possible role of membrane TNF / P.L. Herrera, D.M. Harlan, P. Vassalli // *Proc. Natl .Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 279–284.
372. Heterogeneity among patients with latent autoimmune diabetes in adults / T. Maruyama, T. Nakagawa, A. Kasuga, M. Murata // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2011. – Vol. 27. – P. 971–974.
373. Heterogeneity of Patients With Latent Autoimmune Diabetes in Adults : Linkage to Autoimmunity Is Apparent Only in Those With Perceived Need for Insulin Treatment : Results of the Nord-Trondelag Health Study (HUNT) / M.A. Radtke, T.I. Lund Nilsen, K. Midthjell, V. Grill // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32. – P. 245–250.
374. Heterozygosity for MICA5.0/MICA5.1 and HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 are independent genetic risk factors for latent autoimmune diabetes in adults / C. Torn, M. Gupta, Z.L. Nikitina et al.// *Human Immunol.* – 2003. Vol. 64, N 9. – P. 902–909.
375. High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years: The Belgian Diabetes Registry / C.L. Vandewalle, A. Falorni, S. Svanholm et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1995. – Vol. 80, N 3. – P. 846–851.
376. Highly variable clinical phenotypes of hypomorphic RAG1 mutation / E.M. Avila, G. Uzel, A. Hsu et al. // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 126, N 5. – P. 1248–1252.
377. HLA and glutamic acid decarboxylase in human insulin-dependent diabetes mellitus / C.B. Sanjeevi, A. Falorni, I. Kockum et al. // *Diabet. Med.* – 1996. – Vol. 13, N 3. – P. 209–217.
378. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+)CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization / R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, S. Sakaguchi // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201. – P. 723–735.

379. Honeyman, M.C. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents / M.C. Honeyman, N.L. Stone, L. Harrison // *Mol. Med.* – 1998. – Vol. 4, N 4. – P. 231–239.
380. Hsieh, C.-S. Sliding set-points of immune responses for therapy of autoimmunity / C.-S. Hsieh, J.L. Bautista // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 1819–1823.
381. Human autoantibodies modulate the T cell epitope repertoire but fail to unmask a pathogenic cryptic epitope / S. Quaratino, J. Ruf, M. Osman et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 557–563.
382. Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1 $\beta$  and Fas ligation / A.C. Loweth, G.T. Williams, R.F.L. James et al. // *Diabetes.* – 1998. – Vol. 47. – P. 727–732.
383. Human pancreatic duct cells can produce tumour necrosis factor-alpha that damages neighbouring beta cells and activates dendritic cells / B. Movahedi, M. van de Casteele, N. Caluwe et al. // *Diabetologia.* – 2004. – Vol. 47, N 6. – P. 998–1008.
384. Hurthle cell lesions of the thyroid: combined study using transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and immunocytochemistry. / J.M. Nesland, M.A. Sobrincho-Simoes, R. Holm et al. // *J. Ultrastruct. Pathol.* – 1988. – Vol. 8. – P. 269.
385. Hyperglycemia induces early upregulation of the calcium sensor KChIP3/DREAM/calsenilin in the rat retina / E. Chavira-Suarez, A. Sandoval, H. Quintero et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 418. – P. 420–425.
386. Hyperinsulinemic hypoglycaemia with nesidoblastosis after gastric-bypass surgery / G.J. Service, G.B. Thompson, F.J. Service et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 249–254.
387. IA-2 and IA-2 beta are major autoantigens in IDDM and the precursors of the 40 kDa and 37 kDa tryptic fragments / A.L. Notkins, J. Lu, Q. Li et al. // *J. Autoimmun.* – 1996. – Vol. 9, N 5. – P. 677–682.
388. IA-2 antibody prevalence and risk assessment of early insulin requirement in subjects presenting with type 2 diabetes (UKPDS 71) / G.F. Bottazzo, E. Bosi, C.A. Cull et al. // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48. – P. 703–708.
389. IA-2 autoantibodies predict impending Type I diabetes in siblings of patients / K. Decochez, I.H. de Leeuw, B. Keymeulen et al. // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45. – P. 1658–1666.

390. I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice / H. Noorchashm, Y.K. Lieu, N. Noorchashm et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163. – P. 743–750.
391. IAN5 polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus / M.K. Lim, D.H. Sheen, S.A. Kim et al. // *Lupus.* – 2009. – Vol. 18, N 12. – P. 1045–1052.
392. Ibbm1 and Ibbm2 homozygous WOK.4BB rats develop lymphopenia, but no hyperglycemia like the BB/OK rats / J. Bahr, N. Follak, N. Klöting et al. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2011. – Vol. 119. – P. 395–400.
393. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules / M. Solimena, R. Dirks, J.M. Hermel et al. // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15. – P. 2102–2114.
394. Identification and characterization of glim38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes / H.J. Aanstoot, S.M. Kang, J. Kim et al. // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97. – P. 2772–2783.
395. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules / F. Chimienti, S. Devergnas, A. Favier, M. Seve // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – P. 2330–2337.
396. Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes / C. Panagiotopoulos, H. Qin, R. Tan et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 2647–2651.
397. Identification of HLA-DRB1 alleles associated with Graves' disease in Koreans by sequence-based typing / H.W. Jang, H.W. Shin, H.J. Cho et al. // *Immunol Invest.* – 2011. – Vol. 40. – P. 172–182.
398. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40k autoantigen and a target of islet cell antibodies / E. Bonifacio, V. Lampasona, S. Genovese et al. // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155. – P. 5419–5426.
399. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+T cells in autoimmune disease / S.M. Lieberman, A.M. Evans, B. Han et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 8384–8388.
400. Identification of Tyrosine Phosphatase 2(256–760) Construct as a New, Sensitive Marker for the Detection of Islet Autoimmunity in Type 2 Diabetic Patients : The Non-Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study 2

- / C. Tiberti, C. Giordano, M. Locatelli et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1276–1283.
401. IDF's Diabetes Atlas / International Diabetes Federation. – 5th ed. – Brussels, 2011. – 159 p.
  402. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis / X. Wang, M. Chen, K.P. Wandinger et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 548–557.
  403. IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice / A. Rabinovitch, W. Suarez-Pinzon, O. Sorensen et al. // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154. – P. 4874–4882.
  404. IFN-gamma low production capacity in type 1 diabetes mellitus patients at onset of disease / M.A. Avanzini, L. Ciardelli, E. Lenta et al. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2005. – Vol. 113, N 6. – P. 313–317.
  405. IFN- $\gamma$  is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40L T cell costimulation pathways / B.T. Konieczny, Z. Dai, E.T. Elwood et al. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 2059–2064.
  406. IgG4-subclass of glutamic acid decarboxylase antibody is more frequent in latent autoimmune diabetes in adults than in type 1 diabetes / M. Hillman, C. Torn, H. Thorgeirsson et al. // *Diabetologia*. – 2004. – Vol. 47, N 11. – P. 1984–1989.
  407. Ihnatko, R. TNF signaling: early events and phosphorylation / R. Ihnatko, M. Kubes // *Gen Physiol Biophys*. – 2007. – Vol. 26, N 3. – P. 159–167.
  408. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination / B. Gran, G.X. Zhang, S. Yu et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 7104–7110.
  409. IL-18 binding protein fusion construct delays the development of diabetes in adoptive transfer and cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mouse / P. Zacccone, J. Phillips, I. Conget et al. // *Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 115, N 1. – P. 74–79.
  410. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis / H. Rothe, A. Hausmann, K. Casteels et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163, N 3. – P. 1230–1236.

411. IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  mark  $\beta$ -cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes / A. Amrani, J. Verdaguer, S. Thiessen et al. // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105. – P. 459–468.
412. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts / B. Steiger, P.W. Nickerson, W. Steurer et al. // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155. – P. 489–498.
413. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells / Y. Grinberg-Blayer, A. Baeyens, S. You et al. // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 1871–1878.
414. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T-cells in human / S.V. Eijnden, S. Goriely, D. de Wit et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35. – P. 469–475.
415. IL4 and IL4alpha genes are not linked or associated with type 1 diabetes / S.K. Reimsnider, S.E. Eckenrode, M.P. Marron et al. // *Pediatr. Res.* – 2000. – Vol. 47. – P. 246–249.
416. Immunocytochemical identification of oxyphilic mitochondrion-rich cells / M. Papotti, P. Gugliotta, G. Forte, G. Bussolati // *Applied Immunohistochemistry.* – 1994. – Vol. 2. – P. 261–267.
417. Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM / T. Kobayashi, K. Tamemoto, K. Nakanishi et al. // *Diabetes Care.* – 1993. – Vol. 16, N 5. – P. 780–788.
418. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, J. Shimizu et al. // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 182. – P. 18–32.
419. Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277<sup>TM</sup> therapy in clinical type I diabetes / V.A.L. Huurman, P.E. Meide, G. Duinkerken et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – Vol. 152. – P. 488–497.
420. Immunological heterogeneity in type 1 diabetes: Presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease / J. Seissler, J.J. de Sonnaville, N.G. Morgenthaler et al. // *Diabetologia.* – 1998. – Vol. 41. – P. 891–897.
421. Immunomodulation in type 1 diabetes by NBI-6024, an altered peptide ligand of the insulin B epitope / D.G. Alleva, R.A. Maki, A.L. Putnam et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – Vol. 63, N 1. – P. 59–69.
422. Immunopathogenesis of diabetes mellitus / A.A. Rossini, D.L. Greiner, H.P. Friedman et al. // *Diabetes Rev.* – 1993. – Vol. 1. – P. 43–75.
423. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha

- mediated enhancement of T cell responses / P. Scheurich, B. Thoma, U. Ucer // *J. Immunol.* – 1987. – Vol. 138. – P. 1786–1790.
424. Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice / Z. Dai, B.T. Konieczny, F.K. Baddoura et al. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 1659–1663.
425. Impaired post-thymic development of regulatory CD4+25+ T cells contributes to diabetes pathogenesis in BB rats / P. Poussier, T. Ning, T. Murphy et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 4081–4089.
426. Impaired survival of peripheral T-cells, disrupted NK/NKT cell development, and liver failure in mice lacking Gimap5 / R.D. Schulteis, H. Chu, X. Dai et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – P. 4905–4914.
427. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab / B. Yazdani-Biuki, H. Stelzl, H.P. Brezinschek et al. // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 34. – P. 641–642.
428. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis / G.F. Bottazzo, B.M. Dean, J.M. McNally et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – Vol. 313. – P. 353–360.
429. In vitro expanded humanCD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation / K.E. Earle, Q. Tang, X. Zhou et al. // *Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 115. – P. 3–9.
430. Increase in simultaneous coexpression of naive and memory lymphocyte markers at diagnosis of IDDM / R.A. Smerdon, M. Peakman, M.J. Hussain et al. // *Diabetes.* – 1993. – Vol. 42. – P. 127–133.
431. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis / J. Zhang, S. Markovic-Plese, B. Lacet et al. // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 973–984.
432. Increased in vivo frequency of IA-2 peptide-reactive IFNgamma+/IL-4- T cells in type 1 diabetic subjects / B.A. Herzog, P.A. Ott, M.T. Dittrich et al. // *J. Autoimmun.* – 2004. – Vol. 23, N 1. – P. 45–54.
433. Increased number of islet associated macrophages in type 2 diabetes / J.A. Ehses, A. Perren, E. Eppler et al. // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56. – P. 2356–2370.
434. Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus / L.D. Petersen, G. Duinkerken, G.J. Bruining et al. // *J. Autoimmun.* – 1996. – Vol. 9. – P. 731–737.

435. Increased resistance to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory t cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes / J.M. Lavson, J. Tremble, H. Dayan et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – Vol. 154. – P. 353–359.
436. Independent involvement of CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells and thyroid autoantibodies in disease severity of Hashimoto's disease / M. Watanabe, N. Yamamoto, H. Maruoka et al. // *Thyroid.* – 2002. – Vol. 12, N 9. – P. 801–808.
437. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tcells / M.R. Walker, D.J. Kasprowicz, V.H. Gersuk et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 1437–1443.
438. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells / F. Ortis, P. Pirot, N. Naamane et al. // *Diabetologia.* – 2008. – Vol. 51, N 7. – P. 1213–1225.
439. Inflammation and Glucose Intolerance / M. Wolf, J. Sauk, A. Shah et al. // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27. – P. 21–27.
440. Inflammatory mechanisms in diabetes: lessons from the B-cell / H.E. Hohmeier, W. Tran, G. Chen et al. // *Int. J. Obesity.* – 2003. – Vol. 27. – P. 12–16.
441. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes / M.Y. Donath, J. Storling, K. Maedler, T. Mandrup-Poulsen // *J. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 81. – P. 455–470.
442. Inhibition of autoimmune diabetes by Fas ligand: The paradox is solved / S. Kim, K.A. Kim, D.Y. Hwang et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 2931–2936.
443. Innate and adaptive functions of the CD1 pathway of antigen presentation / S.H. Park, Y.H. Chiu, J. Jayawardena et al. // *Semin. Immunol.* – 1998. – Vol. 10. – P. 391–398.
444. Insulin and Glucagon Secretion in Patients with Slowly Progressing Autoimmune Diabetes (LADA) / A. Carlsson, G. Sundkvist, L. Groop, T. Tuomi // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 76–80.
445. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment / J.P. Palmer, C.M. Asplin, P. Clemons et al. // *Science.* – 1983. Vol. 222, N 4630. – P. 1337–1339.
446. Insulin autoantibodies : more specific than proinsulin autoantibodies for prediction of type 1 diabetes / A.J. Williams, P.J. Bingley, R.E. Chance, E.A. Gale // *J. Autoimmun.* – 1999. – Vol. 13, N 3. – P. 357–363.



447. Insulin intervention in slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus / T. Maruyama, S. Tanaka, A. Shimada et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93. – P. 2115–2121.
448. Insulin Needs after CD3-Antibody Therapy in New-Onset Type 1 Diabetes / B. Keymeulen, E. Vandemeulebroucke, A.G. Ziegler et al. // *N. Eng. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 2598–2608.
449. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state / D. Tripathy, A.L. Carlsson, M. Lehto et al. // *Diabetologia.* – 2000. – Vol. 43. – P. 1476–1483.
450. Insulin Treatment in Patients With Type 1 Diabetes Induces Upregulation of Regulatory T-Cell Markers in Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated With Insulin In Vitro / M. Tiittanen, J.T. Huupponen, M. Knip, O. Vaarala // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55, N 12. – P. 3446–3454.
451. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma / N. Sarvetnick, D. Liggitt, S.L. Pitts et al. // *Cell.* – 1988. – Vol. 52. – P. 773–777.
452. Insulin-dependent? // *Lancet.* – 1985. – Vol. 2. – P. 809–810.
453. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins / M.E. Roehrich, V. Mooser, V. Lenain et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 18368–18375.
454. Interferon $\gamma$  eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells / D.K. Dalton, L. Haynes, C.-Q. Chu et al. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 117–122.
455. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice / S. Trembleau, G. Penna, E. Bosi et al. // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 181. – P. 817–821.
456. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation / I.B. McInnes, J.A. Gracie, B.P. Leung et al. // *Immunol Today.* – 2000. – Vol. 21. – P. 312–315.
457. Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults / P. Novota, K. Kolostova, D. Pinterova et al. // *Immunol. Lett.* – 2005. – Vol. 96, N 2. – P. 247–251.
458. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes / A. Kretowski, K. Mironczuk, A. Karpinska et al. // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51. – P. 3347–3349.

459. Interleukin-2 signaling is for CD-4 regulatory T-cell function / G. Furtado, C. de Lafaille, N. Kutchukhidze et al. // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196. – P. 851–857.
460. Interleukin-27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin-17 producing T-cells / M. Batten, J. Li, S. Yi et al. // *Nature Immunol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 1–8.
461. Interleukin-4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice / M.J. Rapoport, A. Jaramillo, D. Zipris et al. // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178. – P. 87–99.
462. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing in human CD41 T-cell-mediated cytotoxicity / N. Kayagaki, N. Yamaguchi, M. Nakayama et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 2639–2647.
463. Is latent autoimmune diabetes in adults distinct from type 1 diabetes or just type 1 diabetes at an older age? / J.P. Palmer, C.S. Hampe, H. Chiu H. et al. // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54, suppl. 2. – P. S62–S67.
464. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes / R.L. Hull, G.T. Westermark, P. Westermark, S.E. Kahn // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 89. – P. 3629–3643.
465. Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70) / T.M. Davis, A.D. Wright, Z.M. Mehta et al. // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48. – P. 695–702.
466. Islet autoantibodies, nationality and gender: a multinational screening study in first-degree relatives of patients with Type I diabetes / A.J. Williams, P.J. Bingley, W.P. Moore, E.A. Gale // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45, N 2. – P. 217–223.
467. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies in hyperthyroid patients: at diagnosis and following treatment / B. Hallengren, A. Falorni, M. Landin-Olsson et al. // *J. Intern. Med.* – 1996. – Vol. 239, N 1. – P. 63–68.
468. Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies but not the clinical phenotype help to identify type 1 1/2 diabetes in patients presenting with type 2 diabetes / R. Juneja, I.B. Hirsch, R.G. Naik et al. // *Metabolism.* – 2001. – Vol. 50. – P. 1008–1013.
469. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases / D.U. Rabin, S.M. Pleasic, J.A. Shapiro et al. // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 152. – P. 3183–3188.
470. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen / M. Pietropaolo, L. Castano, S. Babu et al. // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 92. – P. 359–371.

471. Islet cell autoantigens / A. Katsarou, B. Holm, K. Lynch, E. Lernmark // Contemporary Endocrinology: Autoimmune Diseases in Endocrinology / ed. A.P. Weetman. – New Jersey: Humana Press, 2008. – P. 243–274.
472. Islet-specific expression of IL-10 promotes diabetes in nonobese diabetic mice independent of Fas, perforin, TNF receptor-1, and TNF receptor-2 molecules / B. Balasa, K. Van Gunst, N. Jung et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165. – P. 2841–2849.
473. Jaber-Douraki, M. Predictive models of type 1 diabetes progression: understanding T-cell cycles and their implications on autoantibody release [Electronic resource] / M. Jaber-Douraki, M. Pietropaolo, A. Khadra // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 4. – URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0093326>.
474. Jaeger, B.N. Natural killer cell tolerance: control by self or self-control? [Electronic resource] / B.N. Jaeger, E. Vivier // Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol. – 2012. – Vol. 4, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22383753>
475. Jeffery, R.W. Is the obesity epidemic exaggerated? No / R.W. Jeffery, N.E. Sherwood // BMJ. – 2008. – Vol. 336. – P. 245.
476. Jones, B. 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 / B. Jones // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1999. – Vol. 84. – P. 4106–4110.
477. Kahaly, G.J. Autoimmune Polyglandular Syndromes / G.J. Kahaly // Hot thyroidology. – 2007. – N 1. – P. 1–6.
478. Kanel, R. Short-term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset redistribution / R. Kanel, P.J. Mills, J.E. Dimsdale // Life Sci. – 2001. – Vol. 69. – P. 255–262.
479. Karlsson Faresjo, M.G. Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes / M.G. Karlsson Faresjo, J. Ernerudh, J. Ludvigsson // Scand. J. Immunol. – 2004. – Vol. 59, N 5. – P. 517–526.
480. Karlsson, M.G. Th1-like dominance high risk first-degree relatives of type I diabetic patients / M.G. Karlsson, S.S. Lawesson, J. Ludvigsson // Diabetologia. – 2000. – Vol. 43, N 6. – P. 742–749.
481. Karvonen, M. The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger: The Finnish Childhood Diabetes Registry Group / M.

- Karvonen, J. Pitkaniemi, J. Tuomilehto // *Diabetes Care*. – 1999. – Vol. 22. – P. 1066–1070.
482. Katz, J.D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes / J.D. Katz, C. Benoist, D. Mathis // *Science*. – 1995. – Vol. 268. – P. 1185–1188.
483. Ke, S. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system / S. Ke, L. Bin // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – P. 900–911.
484. Kelso, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? / A. Kelso // *Immunol. Today*. – 1995. – Vol. 16. – P. 374–379
485. Kent, S.C. Cytokines and Human Type 1 Diabetes / S.C. Kent, V. Viglietta, D.A. Hafler // *Cytokines and Autoimmune Diseases* / eds. V.L. Kuchroo et al. – New Jersey: Humana Press Inc., 2002. – P. 295–316.
486. Kirkegaard, T. Lysosomal involvement in cell death and cancer / T. Kirkegaard, Jaattela M. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1793. – P. 746–754.
487. Komorowski, J. Interleukins in Graves disease / J. Komorowski // *Meth. Mol. Med.* – 2001. – N 1. – P. 251–261.
488. Korf, H. Pathogenesis of type 1 diabetes: immunological pathways / H. Korf, C. Gysemans, L. Overbergh // *Int. Diabetes*. – 2010. – Vol. 22. – P. 121–127.
489. Krischer, J.P. Male sex increases the risk of autoimmunity but not type 1 diabetes / J.P. Krischer, D.D. Cuthbertson, C. Greenbaum // *Diabetes Care*. – 2004. – Vol. 27, N 8. – P. 1985–1990.
490. Krysiak, R. An unusual clinical presentation of the autoimmune polyendocrine syndrome/ R. Krysiak, B. Okopien, Z.S. Herman // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2005. – Vol. 114, N 5. – P. 1093–1097.
491. Kuglin, B. Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment / B. Kuglin, F.A. Gries, H. Kolb // *Diabetes*. – 1988. – Vol. 37. – P. 130–132.
492. Kumar, V. An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes / V. Kumar, E. Sercarz // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 182. – P. 113–121.
493. LaBue, M. Thyocytes isolated from autoimmune-diseased thyroids secrete soluble tumor necrosis factor-R1 that is related to their elevated protein kinase C activity / M. LaBue, K.K. Colburn, L.M. Green // *Thyroid*. – 2004. – Vol. 14, N 4. – P. 249–262.
494. Lam-Tse, W.K. Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity? / W.K.

- Lam-Tse, A. Lernmark, H.A. Drexhage // Springer Semin Immunopathol. – 2002. – Vol. 24. – P. 297–321.
495. Late progression to diabetes and evidence for chronic beta-cell autoimmunity in identical twins of patients with type I diabetes / C.F. Verge, R. Gianani, L. Yu et al. // Diabetes. – 1995. – Vol. 44, N 10. – P. 1176–1179.
496. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent / S. Fourlanos, F. Dotta, C.J. Greenbaum et al. // Diabetologia. – 2005. – Vol. 48. – P. 2206–2212.
497. Latent Autoimmune Diabetes in Adults / G. Stenstrom, A. Gottsater, E. Bakhtadze et al. // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, suppl. 2. – P. S68–S72.
498. Latent autoimmune diabetes in adults / M. Maioli, L. Puddu, G.M. Pes et al. // Clin Ter. – 2006. – Vol. 157, N 1. – P. 69–78.
499. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years / M.K. Andersen, V. Lundgren, J.A. Turunen et al. // Diabetes Care. – 2010. – Vol. 33. – P. 2062–2064.
500. Latent autoimmune diabetes in adults in Iceland: prevalence, phenotype and relatedness / A.M. Jonsdottir, T. Aspelund, G. Sigurdsson et al. // Laeknabladid. – 2005. – Vol. 91, N 12. – P. 909–914.
501. Lawrence, M.C. Calcineurin/nuclear factor of activated T cells and MAPK signaling induce TNF-alpha gene expression in pancreatic islet endocrine cells / M.C. Lawrence, B. Naziruddin, M.F. Levy // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 14. – P. 1025–1036.
502. Lee, K.H. Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes / K.H. Lee, K.W. Wucherpfennig, D.C. Wiley // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2, N 6. – P. 501–507.
503. Leiter, E.H. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes : 2. In opposition to this proposal / E.H. Leiter, M. von Herrath // Diabetologia. – 2004. – Vol. 47, N 10. – P. 1657–1660.
504. Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets / K. Maedler, P. Sergeev, J.A. Ehses et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 8138–8143.
505. Lernmark, A. Immunomodulation with human recombinant autoantigens / A. Lernmark, C.D. Agardh // Trends Immunol. – 2005. – Vol. 26, N 11. – P. 608–612.
506. Lernmark, A. Molecular Biology of B-Cell Destruction by Autoimmune Processes / A. Lernmark, C.H. Chung // Contemporary Endocrinology: Type 1 Diabetes: Etiology and Treatment / ed. M.A. Sperling. – New Jersey: Humana Press Inc., 2003. – P. 71–92.

507. Li, Z. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells / Z. Li, W. Zhang, A. Sima // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2003. – Vol. 19. – P. 375–385.
508. Libman, I.M. Coexistence of type 1 and type 2 diabetes mellitus: ‘double’ diabetes? / I.M. Libman, D.J. Becker // *Pediatr. Diabetes.* – 2003. – Vol. 4. – P. 110–113.
509. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele / G. Morahan, D. Huang, S.I. Ymer et al. // *Nat. Gen.* – 2001. – Vol. 27. – P. 218–221.
510. Lio, C.W. A two-step process for thymic regulatory T cell development / C.W. Lio, C.S. Hsieh // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28. – P. 100–111.
511. Locksley, R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P. 487–501.
512. Low density lipoprotein can cause death of islet beta cells by its cellular uptake and oxidative modification / M. Cnop, J.C. Hannaert, A.Y. Gruppig, D.G. Pipeleers // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143. – P. 3449–3453.
513. Low prevalence of antibodies to GAD65 in a 50- to 74-year-old general Dutch population: The Hoorn Study / J.B. Ruige, M.R. Batstra, H.-J. Aanstoot et al. // *Diabetes Care.* – 1997. – Vol. 20. – P. 1108–1110.
514. Low prevalence of islet autoimmunity in adult diabetes and low predictive value of islet autoantibodies in the general adult population of northern Italy / E.P. Bosi, N.T. Garancini, F. Poggiali et al. // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42. – P. 840–844.
515. MacEwan, D.J. TNF ligand and receptors - a matter of life and death / D.J. MacEwan // *Br. J. Pharm.* – 2002. – Vol. 135. – P. 855–875.
516. MacEwan, D.J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences / D.J. MacEwan // *Cell Signal.* – 2002. – Vol. 14, N 6. – P. 477–492.
517. Maciejwska-Jeske, M. C-peptid and its role in the physiology and chosen endocrinopathies / M. Maciejwska-Jeske, A. Szczesna, B. Meczekalski // *Pol. Merkur Lekarski.* – 2011. – Vol. 31. – P. 75–79.
518. Mack, A. Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T-cells / A. Mack, G. Hacker // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32. – P. 1986–1992.
519. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1

- diabetes / S. Uno, A. Imagawa, K. Okita et al. // *Diabetologia*. – 2007. – V. 50, N 3. – P. 596–601.
520. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus / A. Hanninen, S. Jalkanen, M. Salmi et al. // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol. 90. – P. 1901–1910.
521. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement / T.P. DiLorenzo, R.T. Graser, T. Ono et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95, N 21. – P. 12538–12543.
522. Malek, T.R. The biology of interleukin-2 / T.R. Malek // *Ann. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 453–479.
523. Male-to-female excess in diabetes diagnosed in early adulthood is not specific for the immune-mediated form nor is it HLA-DQ restricted: possible relation to increased body mass index / I. Weets, J. van Autreve, B.J. van der Auwera et al. // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44, N 1. – P. 40–47.
524. Mandrup-Poulsen, T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes / T. Mandrup-Poulsen // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66, N 8. – P. 1433–1440.
525. Mangan, P.R. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage / P.R. Mangan // *Nature*. – 2006. – Vol. 18. – P. 231–234.
526. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study / M.T. Schram, N. Chaturvedi, C. Schalkwijk et al. // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, N 2. – P. 370–378.
527. Martin, J. D. Hurthle cell tumors of the thyroid / J. D. Martin, D. C. Elkin // *Ann Surg.* – 1939. - Vol. 110. - № 2. - P. 169–176.
528. Massart, C. Peripheral blood and intrathyroidal T cell clones from patients with thyroid autoimmune diseases / C. Massart, G. Caroff, D. Maugendre // *Autoimmunity*. – 1999. – Vol. 31. – P. 163–174.
529. Mathis, D. Beta-Cell death during progression to diabetes / D. Mathis, L. Vence, C. Benoist // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 792–798.
530. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity / N. Mitsiades, W.H. Yu, V. Poulaki et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 577–581.
531. Matsuzawa, A. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling / A. Matsuzawa, H. Ichijo // *Antioxid. Redox Signal.* – 2005. – N 7. – P. 472–481.

532. Matveyenko, A.V. Islet amyloid polypeptide (IAPP) transgenic rodents as models for type 2 diabetes / A.V. Matveyenko, P.C. Butler // *Ilar J.* – 2006. – Vol. 47. – P. 225–233.
533. McDevitt, H. Specific antigen vaccination to treat autoimmune disease / H. McDevitt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, suppl 2. – P. 14627–14630.
534. McLachlan, S.M. Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity / S.M. McLachlan, B. Rapoport // *Endocr. Rev.* – 2014. – Vol. 35. – P. 59–105.
535. Mechanism underlying counterregulation of autoimmune diabetes by IL4 / R. Mueller, L.M. Bradley, T. Krahle et al. // *Immunity.* – 1997. – Vol. 7. – P. 411–418.
536. Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children / A.B. Erbagci, M. Tarakcioglu, Y. Coskun et al. // *Clin. Biochem.* – 2001. – Vol. 34, N 8. – P. 645–650.
537. Metabolic Syndrome and Autoimmune Diabetes: Action LADA 3 / M.I. Hawa, C. Thivolet, D. Mauricio et al. // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 160–164.
538. Metabolic syndrome and latent autoimmune diabetes in adults / X. Li, Z.G. Zhou, L. Yang et al. // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* – 2003. – Vol. 25, N 6. – P. 676–679.
539. Mi, Q.S. CD1d-restricted NKT regulatory cells: functional genomic analyses provide new insights into the mechanisms of protection against Type 1 diabetes / Q.S. Mi, C. Meagher, T.L. Delovitch // *Generation and effector functions of regulatory lymphocytes (Novartis Foundation Symposium 252)* / eds. G. Bock, J. Goode. – Chichester: Wiley, 2003. – P. 146–164.
540. Mi, Q.S. Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells / Q.S. Mi, D. Ly, P. Zucker // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, N 5. – P. 1303–1310.
541. Microsatellite allele A5.1 of MHC class I chain-related gene A is associated with latent autoimmune diabetes in adults in Latvia / L. Berzina, A. Shtauvere-Brameus, I. Rumba et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 958. – P. 353–356.
542. Miossec, P. Control and induction of autoimmunity by cytokine and anti-cytokine treatments / P. Miossec // *Mol. Autoimmunity.* – 2005. – Vol. 6. – P. 329–345.



543. Mire-Sluis, A.R. The World Health Organization International Collaborative Study for islet cell antibodies / A.R. Mire-Sluis, R. Gaines Das, A. Lernmark // *Diabetologia*. – 2000. – Vol. 43, N 10. – P. 1282–1292.
544. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of  $\beta$ -cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes / C.J. Greenbaum, T. Mandrup-Poulsen, P. Friedenberg McGee et al. // *Diabetes Care*. – 2008. – Vol. 31. – P. 1966–1971.
545. Miyauchi, S. Increased levels of serum interleukin-18 in Graves disease / S. Miyauchi, B. Matsuura, M. Onji // *Thyroid*. – 2000. – Vol. 10, N 9. – P. 815–819.
546. Mogensen, C.E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy / C.E. Mogensen, C.K. Christensen, E. Vittinghus // *Diabetes*. – 1983. – Vol. 32, suppl. 2. – P. 64–78.
547. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients / N. Itoh, T. Hanafusa, A. Miyazaki et al. // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 92. – P. 2313–2322.
548. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic  $\beta$ -cell turnover and function / K. Maedler, J. Oberholzer, P. Bucher et al. // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – P. 726–733.
549. Monti, P. Rapamycin Monotherapy in Patients With Type 1 Diabetes Modifies CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T-Cells / P. Monti, M. Scirpoli, P. Maffi // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57, N 9. – P. 2341–2347.
550. Mori, K. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: a key player or just a bystander? / K. Mori, K. Yoshida. // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* – 2010. – Vol. 5. – P. 418–424.
551. Moudgil, K.D. The self-directed T cell repertoire: its creation and activation / K.D. Moudgil, E.E. Sercarz // *Rev. Immunogenet.* – 2000. – Vol. 2, N 1. – P. 26–37.
552. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function / A. Bendelac, M. Rivera, H.-S. Park, J.H. Roark // *Ann. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol. 15. – P. 535–562.
553. Mueller, R. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice / R. Mueller, T. Krahel, N. Sarvetnick // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184. – P. 1093–1099.

554. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes / A. Kukreja, G. Cost, J. Marker et al. // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109. – P. 131–140.
555. Murinson, B.B. Stiff-person syndrome / B.B. Murinson // *Neurologist.* – 2004. – Vol. 10, N 3. – P. 131–137.
556. Nagata, S. The Fas death factor / S. Nagata, P. Golstein // *Science.* – 1995. – Vol. 267. – P. 1449–1456.
557. Naik, R.G. Latent Autoimmune Diabetes in Adults / R.G. Naik, B.M. Brooks-Worrell, J.P. Palmer // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 94. – P. 4635–4644.
558. Naik, R.G. Latent autoimmune diabetes in adults / R.G. Naik, J.P. Palmer // *Type 1 diabetes in adults: Principles and Practice* / eds. S. Jabbour, E.A. Stephens. – New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2008. – P. 17–32.
559. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions / J.H. Duarte, S. Zelenay, M.L. Bergman et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39. – P. 948–955.
560. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? / J.D. Trudeau, J.P. Dutz, E. Arany et al. // *Diabetes.* – 2000. – Vol. 49. – P. 1–7.
561. Neves, S.R. G-protein pathways / S.R. Neves, P.T. Ram, R. Iyengar // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 1636–1639.
562. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt / I. Storling, J. Binzer, A.K. Andersson et al. // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48, N 10. – P. 2039–2050.
563. NK cell activity in patient with Graves disease and Hashimotos thyroiditis / B. Wenzel, A. Chow, R. Baur et al. // *Thyroid.* – 1998. – Vol. 8. – P. 1019–1022.
564. NOD mouse diabetes: The ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells / O.S. Birk, D. Elias, A.S. Weiss et al. // *J. Autoimmun.* – 1996. – Vol. 9. – P. 159–166.
565. Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic B- cells / J.M. Phillips, S.Z. Harach, N.M. Parish et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 1949–1955.
566. Normal weight promotes remission and low number of islet antibodies prolong the duration of remission in Type 1 diabetes / A. Scholin, C. Torn, L. Nystrom, C. Berne et al. // *Diabet Med.* – 2004. – Vol. 21, N 5. – P. 447–455.
567. Notkins, A.L. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues / A.L. Notkins, A. Lernmark // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, N 9. – P. 1247–1252.

568. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type 1 diabetes / C.F. Verge, R. Gianani, I. Kawasake et al. // *J. Autoimmun.* – 1996. – Vol. 9. – P. 370–383.
569. Oliveira, J.B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome / J.B. Oliveira, T. Fleisher // *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 497–503.
570. Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4<sup>+</sup> T cells that suppress adoptive transfer of diabetes / I. Bergerot, N. Fabien, V. Maguer, C. Thivolet // *J. Autoimmun.* – 1994. – Vol. 7. – P. 655–663.
571. Oral probiotic administration in the NOD mouse induces systemic and islet IL-10 production and down regulates pancreatic expression of proinflammatory cytokine and chemokines / V. Bonato, S. Dionisi, F. Vendrame et al. // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48, suppl. 1. – A 193.
572. Orgiazzi, J. Thyroid autoimmunity // *Bull. Acad. Natl. Med.* – 2013. – Vol. 197, N 1. – P. 43–59.
573. Other complications and associated conditions with diabetes in children and adolescents / O. Kordonouri, A.M. Maguire, M. Knip et al. // *Pediatr Diabetes.* – 2009. – Vol. 10, suppl. 12. – P. 204–210.
574. Owens, T. Genetic models for CNS inflammation / T. Owens, H. Wekerie, J. Antel // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 161–166.
575. Palmer, J.P. Predicting IDDM. Use of humoral immune markers / J.P. Palmer // *Diabetes Rev.* – 1993. – Vol. 1. – P. 104–115.
576. Palmer, J.R. What's in a name? Latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes / J.P. Palmer, I.B. Hirsh // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26. – P. 536–538.
577. Pan, T.R. Association of TNF- $\alpha$  gene polymorphisms with Graves disease susceptibility and early course thyroid stimulating hormone receptor antibody level in Chinese Han population in Anhui region / T.R. Pan, S.M. Xing // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 29, N 3. – P. 347–351.
578. Panczel, P. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA): part of the clinical spectrum of type-1 diabetes mellitus of autoimmune origin / P. Panczel, N. Hosszufalusi, B. Bornemisza // *Orv Hetil.* – 2001. – Vol. 142, N 46. – P. 2571–2578.
579. Paolieri, F. Possible pathogenetic relevance of interleukin-1 beta in «destructive» organ-specific autoimmune disease (Hashimoto's thyroiditis) / F.

- Paolieri, C. Salmaso // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 22, N 876. – P. 221–228.
580. Parijs, L. van Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off / L. van Parijs, A.K. Abbas // *Science*. – 1998. – Vol. 280. – P. 243–248.
581. Pasare, C. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells / C. Pasare, R. Medzhitov // *Science*. – 2003. – Vol. 299. – P. 1033–1036.
582. Paschke, R. Lack of intrathyroidal tumor necrosis factor alpha in Graves' disease / R. Paschke // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1993. – Vol. 76. – P. 97–102.
583. Pennline, K.J. Recombinant human IL-10 (rHU IL-10) prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse / K.J. Pennline, E. Roque-Gaffney, M. Monahan // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1994. – Vol. 71. – P. 169–175.
584. Peptide-specific cytotoxicity of T lymphocytes against glutamic acid decarboxylase and insulin in type 1 diabetes mellitus / K. Kimura, T. Kawamura, S. Kadotani et al. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2001. – Vol. 51, N 3. – P. 173–179.
585. Periodontal attachment loss in HIV-infected patients is associated with the major histocompatibility complex 8.1 haplotype (HLA-A1, B8, DR3) / P. Price, D.M. Calder, C.S. Witt et al. // *Tissue Antigens*. – 1999. – Vol. 54, N 4. – P. 391–399.
586. Perros, P. Pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy / P. Perros, P. Kendall-Taylor // *Trends Endocrinol Metab.* – 1993. – Vol. 4, N 8. – P. 270–275.
587. Phenekos, C. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimotos thyroiditis (Th1) and Graves disease (Th2) / C. Phenekos // *Neuroimmunomodulation*. – 2004. – Vol. 11. – P. 209–213.
588. Phenotypic characteristics of GAD antibody-positive recently diagnosed patients with type 2 diabetes in North America and Europe / B. Zinman, S.E. Kahn, S.M. Hafner et al. // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – P. 3193–3200.
589. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency / H.J. Chun, L. Zheng, M. Ahmad et al. // *Nature*. – 2002. – Vol. 419. – P. 395–399.
590. Poitout, V. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity / V. Poitout, R.P. Robertson // *Endocrinology*. – 2002. – Vol. 143. – P. 339–342.

591. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis / C. Giordano, G. Stassi, R. de Maria et al. // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – P. 960–963.
592. Pozzilli, P. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult): Definition, characterization, and potential prevention / P. Pozzilli, U. di Mario // *Diabetes Care*. – 2001. – Vol. 24. – P. 1460–1467.
593. Pozzilli, P. Double Diabetes: A Mixture of Type 1 and Type 2 Diabetes in Youth / P. Pozzilli, C. Guglielmi // *Endocr. Dev.* – 2009. – Vol. 14. – P. 151–166.
594. Prediction of IDDM in the general population : Strategies based on combinations of autoantibody markers / P.J. Bingley, E. Bonifacio, A.J. Williams et al. // *Diabetes*. – 1997. – Vol. 46. – P. 1701–1710.
595. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55–70 years / C.F. Hodkinson, E.A. Simpson, J.M. O'Connor et al. // *J Endocrinol.* – 2009. – Vol. 202. – P. 55–63.
596. Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific Th1 lymphocytes. A gene therapy model for autoimmune diabetes / M. Moritani, K. Yoshimoto, S. Ii et al. // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98. – P. 1851–1859.
597. Prevention of autoimmune diabetes by linomide in nonobese diabetic (NOD) mice is associated with up-regulation of the TCR-mediated activation of p21(ras) / M.J. Rapoport, L. Weiss, A. Mor et al. // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 1245–1255.
598. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice / M. Nakayama, N. Abiru, H. Moriyama et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 435, N 7039. – P. 220–223.
599. Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients / M.N. Pharm, M.I. Hawa, C. Pflieger et al. // *Diabetologia* – 2011. – Vol. 54. – P. 1630–1638.
600. Pro-apoptotic DNA vaccination ameliorates new onset of autoimmune diabetes in NOD mice and induces foxp3+ regulatory T cells in vitro / A. Li, O. Ojogho, E. Franco et al. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, N 23. – P. 5036–5046.
601. Production of IL-10 and IL-12 in CD40 and IL-4 activated mononuclear cells from patients with Graves' disease / M. Itoh, K. Uchimura, M. Makino et al. // *Cytokine*. – 2000. – Vol. 12, N 6. – P. 688–693.

602. Production of interleukin (IL-5) and IL-10 accompanies T helper cell type 1 (Th1) cytokine responses to a major thyroid self-antigen, thyroglobulin, in health and autoimmune thyroid disease / C.H. Nielsen, L. Hegedus, K. Rieneck et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2007. – Vol. 147, N 2. – P. 287–295.
603. Prognostic factors for the course of beta cell function in autoimmune diabetes / C. Torn, M. Landin-Olsson, A. Lernmark et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 4619–4623.
604. Proliferative retinopathy in patients with type 1 diabetes of less than 5 years' duration / B. Bouhanick, C. Bellanne-Chantelot, A. Salle et al. // *Diabetes Metab.* – Paris, 2002. – Vol. 28. – P. 141–144.
605. Prud'homme, G.J. Prevention of autoimmune diabetes by intramuscular gene therapy with a nonviral vector encoding an interferon-gamma receptor/IgG1 fusion protein / G.J. Prud'homme, Y. Chang // *Gene Therapy.* – 1999. – Vol. 6. – P. 771–777
606. Pugliese, A. Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics / A. Pugliese // *International Diabetes.* – 2010. – Vol. 22. – P. 101–111.
607. Rabinovitch, A. Immunoregulation by Cytokines in Autoimmune Diabetes / Cytokines and chemokines in autoimmune disease // *Advances in Experimental Medicine and Biology* / ed. P. Santamaria. – Vol. 520. – New York: Kluwer Academic and Plenum Publishers, 2003. – P. 159–193.
608. Rabinovitch, A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes / A. Rabinovitch // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – Vol. 520. – P. 159–193.
609. Rabinovitch, A. Interleukin 12 mRNA expression in islets correlates with B-cell destruction in NOD mice / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen // *J. Autoimmunity.* – 1996. – Vol. 9. – P. 645–651.
610. Reciprocal developmental pathways for the generations of pathogenic effector Th17 and regulatory T-cells / E. Bettelli, J. Carrier, W. Gao et al. // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 235–238.
611. Recognition of glutamic acid decarboxylase (GAD) by autoantibodies from different GAD antibody-positive phenotypes / C.S. Hampe, L.P. Hammerle, L. Bekris et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85, N 12. – P. 4671–4679.
612. Recombinant Fabs of human monoclonal antibodies specific to the middle epitope of GAD65 inhibit type 1 diabetes-specific GAD65Abs / C.J. Padoa, J.P. Banga, A.M. Madec et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52, N 11. – P. 2689–2695.
613. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells / S. Sharif, G.A. Arreaza, P. Zucker et al. // *J. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 80. – P. 290–300.

614. Regulation of IL-10 release from peripheral blood cells by epinephrine is disturbed in DM type 1 / A. Geissler, M.L. Schneider, B. Bochow et al. // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42, suppl. 1. – A 101.
615. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice / Y. Chang, S.L. Piao, S. Gao, D.M. Zheng // *Wei Sheng Yan Jiu*. – 2005. – Vol. 34. – P. 64–66.
616. Regulatory T Cells and Human Disease / N. Cools, P. Ponsaerts, V.F. Van Tendeloo, N. Zwi // *Clin Dev Immunol*. – 2007. – Vol. 34. – P. 543–557.
617. Regulatory T cells and immune tolerance / S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // *Cell*. – 2008. – Vol. 133, N 5. – P. 775–787.
618. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and ‘quality control’ of immune responses / A. Coutinho, S. Hori, T. Carvalho et al. // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 182. – P. 89–98.
619. Relationship of beta-cell function and autoantibodies to progression and nonprogression of subclinical type 1 diabetes : follow-up of the Seattle Family Study / C.J. Greenbaum, K.L. Sears, S.E. Kahn, J.P. Palmer // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48. – P. 170–175.
620. Relative Levels of the Inflammatory Cytokines TNF $\alpha$  and the soluble CD40 ligand (sCD40L) Profile in Serum Correlate with the Thyrotoxic Activity of Grave's Disease / K. Yamamoto, M. Itoh, T. Okamura A et al. – *Thyroid*. – 2012. – [Epub ahead of print]. Похоже в печать не вышла
621. Report of a WHO Consultation: Obesity: preventing and managing the global epidemic // *WHO Tech. Rep. Ser.* – 2000. – Vol. 894. P. i–xii, 1–253.
622. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus / WHO // *Diabetes Care*. – 1999. – Vol. 27, N 5. – P.1047–1053.
623. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice / N. Itoh, A. Imagawa, T. Hanafusa et al. // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186. – P. 613–618.
624. Rhodes, C.J. Regulation of Beta-Cell Growth and Death // *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* / eds. S. Seino, G.I. Bell. – Japan : Springer, 2008. – P. 215–243.
625. Richardson, S.J. Pancreatic pathology in type 1 diabetes mellitus / S.J. Richardson, N.G. Morgan, A.K. Foulis // *Endocr Pathol*. – 2014. – Vol. 25. – P. 80–92.
626. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function / M.D. Pescovitz, C.J. Greenbaum, H. Krause-Steinrauf et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 26. – Vol. 361. – P. 2143–2152.

627. Roep, B.O. Standardization of T-cell assays in Type I diabetes. Immunology of Diabetes Society T-cell Committee // *Diabetologia*. – 1999. – Vol. 42. – P. 636–637.
628. Roep, B.O. Surrogate end markers during the first year in recent onset IDDM for showing efficacy of treatment and during preventive trials / B.O. Roep, R.R.P. de Vries // *Diabetes Prev. Ther.* – 1996. – Vol. 10. – P. 2–3.
629. Roep, B.O. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail / B.O. Roep // *Diabetes*. – 1996. – Vol. 45. – P. 1147–1156.
630. Role of apoptosis in pathogenesis of thyroiditis / J. Stojanovic, D. Srefanovic, D. Vulovic et al. // *Med. Pregl.* – 2009. – Vol. 62. – P. 49–52.
631. Role of IL-12 receptor  $\beta$ 1 in regulation of T-cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis / G.X. Zhang, S. Yu, B. Gran et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 4485–4492.
632. Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells: a novel function in the control of thyroid hormone release / M. Marino, G. Zheng, L. Chiovato et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 7125–7138.
633. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity / V. Dardalhon, T. Korn, V.K. Kuchroo, A.C. Anderson // *J. Autoimmun.* – 2008. – Vol. 31. – P. 252–256.
634. Ronkainen, M.S. Antibodies to GAD65 epitopes at diagnosis and over the first 10 years of clinical type 1 diabetes mellitus / M.S. Ronkainen, K. Savola, M. Knip // *Scand. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 59, N 3. – P. 334–340.
635. Rosai, J. *Surgical Pathology* / J. Rosai. 9<sup>th</sup> ed. – Mosby, 2004. – Vol. 1. – P. 515–594.
636. Rosiglitazone combined with insulin preserves islet beta cell function in adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA) / Z. Zhou, X. Li, G. Huang et al. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2005. – Vol. 21. – P. 203–208.
637. Rudensky, A.Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance / A.Y. Rudensky, Gavin M., Zheng Y. // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N 2. – P. 253–256.
638. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance / S. Sakaguchi // *Cell*. – 2000. – Vol. 101. – P. 455–458.
639. Salmaso, C. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid disease / C. Salmaso, D. Olive, G. Pesce // *Autoimmunity*. – 2002. – Vol. 35. – P. 159–167.
640. Salvi, M. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking / M. Salvi // *Eur. J. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 143. – P. 197–202.



641. Santangelo, C. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in cytokine-induced human islet cell damage / C. Santangelo, P. Marchetti, L. Marselli // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44, suppl. 1. – A. 41.
642. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death / W. El-Assaad, J. Buteau, M.L. Peyot et al. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144. – P. 4154–4163.
643. Schulze-Koops, H. Lymphopenia and autoimmune diseases / H. Schulze-Koops // *Arthritis Research and Therapy*. – 2004. – Vol. 6, N 4. – P. 178–180.
644. Schutze, S. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization / S. Schutze, V. Tchikov, W. Schneider-Brachert // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2008. – Vol. 9, N 8. – P. 655–662.
645. Seddon, B. Peripheral autoantigen induced regulatory T cells that prevent autoimmunity / B. Seddon, Mason D. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189, N 5. – P. 877–882.
646. Seissler, J. Latent (slowly progressing) autoimmune diabetes in adults / J. Seissler // *Curr. Diab. Rep.* – 2008. – Vol. 8. – P. 94–100.
647. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism / L. Ban, J. Zhang, L. Wang et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105. – P. 13644–13649.
648. Selective unresponsiveness to beta cell autoantigens after induction immunosuppression in pancreas transplantation with anti-interleukin-2 receptor antibody versus anti-thymocyte globulin / P. Linde, P.J.M. Boog, O.M.H. Tysma // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – Vol. 149. – P. 56–62.
649. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs / A. Pugliese, D. Brown, D. Garza et al. // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107, N 5. – P. 555–564.
650. Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA-2 and to a combination of both IA-2 and GAD65 / S. Chen, J. Willis, C. Maclean et al. // *Clin. Chim. Acta*. – 2005. – Vol. 357, N 1. – P. 74–83.
651. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen / B. Knoechel, J. Lohr, E. Kahn et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P. 1375–1386.
652. Serial changes in the prevalence of islet cell antibodies and islet cell antibody titer in children with IDDM of abrupt or slow onset / T. Urakami, Y. Miyamoto, H. Matsunaga et al. // *Diabetes Care*. – 1995. – Vol. 18. – P. 1095–1099.
653. Serum concentrations of markers of TNFalpha and Fas-mediated pathways and renal function in nonproteinuric patients with type 1 diabetes / M.A.

- Niewczas, L.H. Ficociello, A.C. Johnson et al. // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2009. – Vol. 4, N 1. – P. 62–70.
654. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF-alpha receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function / J.J. Dieze, A. Hermanz, S. Medina et al. // Clin. Endocrinol. – 2002. – Vol. 57. – P. 515–521.
655. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children / Y. Dogan, S. Akarsu, B. Ustundag et al. // Mediators Inflamm. – 2006. – Vol. 1. P. 59206.
656. Serum levels of the interferon- $\gamma$ -inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing Type I diabetes / F. Nicoletti, I. Conget, R. di Marco et al. // Diabetologia. – 2001. – Vol. 44, N 3. – P. 309–311.
657. Sex-determining region Y-related protein SOX13 is a diabetes autoantigen expressed in pancreatic islets / H. Kasimiotis, M.A. Myers, A. Argentaro et al. // Diabetes. – 2000. – Vol. 49. – P. 555–561.
658. Sheng, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions / X. Sheng, C. Xuetao // Cell. Mol. Immunol. – 2010. – Vol. 7. – P. 164–174.
659. Shi, Y. Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65 / Y. Shi, B. Veit, S. Baekkeskov // J. Cell. Biol. – 1994. – Vol. 124, N 6. – P. 927–934.
660. SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes / J.M. Wenzlau, O. Moua, S.A. Sarkar et al. // Immunology of Diabetes V: Ann. NY Acad. Sci. – 2008. – Vol. 1150. – P. 256–259.
661. Signaling transducer and activator of transcription (Stat)-6 dependent, but not Stat-4-dependent, immunity is required for the development of autoimmunity in Graves hyperthyroidism / K.J. Land, S.S. Moll, M.H. Kaplan et al. // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145. – P. 3724–3730.
662. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression / N. Hosszufalusi, A. Yatay, K. Rajczy et al. // Diabetes Care. – 2003. – Vol. 26. – P. 452–457.
663. Siminovitch, K.A. PTPN22 and autoimmune disease / K.A. Siminovitch // Nat. Genet. – 2004. – Vol. 36. – P. 1248–1249.

664. Simons, P.J. A functional and phenotypic study on immune accessory cells isolated from the thyroids of Wistar and autoimmune-prone BB-DP rats / P.J. Simons, F.G. Delemarre, H.A. Drexhage // *J. Autoimmun.* – 2000. – Vol. 15. – P. 417–424.
665. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFβ1 coexpressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during autoimmune diabetes / S.M. Pop, C.P. Wong, D.A. Culton et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201. – P. 1333–1346.
666. Skyler, JS. Immunotherapy Trials for Type 1 Diabetes: The Contribution of George Eisenbarth / J.S. Skyler, A. Pugliese // *Diabetes technology & therapeutics.* – 2013. – Vol. 15. – № 2. – P. S2-13–S2-20.
667. Slowly progressing form of type 1 diabetes mellitus in children: genetic analysis compared with other forms of diabetes mellitus in Japanese children / S. Ohtsu, N. Takubo, M. Kazahari et al. // *Pediatr Diabetes.* – 2005. – Vol. 6, N 4. – P. 221–229.
668. Slowly progressing type 1 diabetes: persistence of islet cell autoantibodies is related to glibenclamide treatment / E. Cabrera-Rode, P. Perich, O. Diaz-Horta et al. // *Autoimmunity.* – 2002. – Vol. 35. – P. 469–474.
669. Small doses of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive beta-cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM / T. Kobayashi, K. Nakanishi, T. Murase, K. Kosaka // *Diabetes.* – 1996. – Vol. 45. – P. 622–626.
670. Smisnans, A. Nutrient regulation of gamma-aminobutyric acid release from islet beta cells / A. Smisnans, F. Schuit, D. Pipeleers // *Diabetologia.* – 1997. – Vol. 40. – P. 1411–1415.
671. Smith, K.A. The interleukin 2 receptor / K.A. Smith // *Annu. Rev. Cell. Biol.* – 1989. – Vol. 5. – P. 397–425
672. Solerte, S.B. Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves disease and Hashimotos thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate / S.B. Solerte // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 152. – P. 703–712.
673. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes / L. Ottonello, G. Tortolina, M. Amelotti et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 3601–3606.
674. Spitzweg, C. Update on the thyroid sodium iodide symporter: a novel thyroid antigen emerging on the horizon / C. Spitzweg, A.E. Heufelder // *Eur. J. Endocrinol.* – 1997. – Vol. 137. – P. 22–23.

675. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes / D.L. Kaufman, M. Clare-Salzler, J. Tian et al. // *Nature*. – 1993. – Vol. 366, N 6450. – P. 69–72.
676. Sprent, J. The thymus and negative selection / J. Sprent, H. Kishimoto // *Immunol. Rev.* – 2002. – Vol. 185. – P. 126–135.
677. Stassi, G. Autoimmune thyroid disease new models of cell death in autoimmunity / G. Stassi, R. Mada // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2, N 3. – P. 195–204.
678. Study of T-cell activation in type I diabetic patients and pre-type I diabetic subjects by cytometric analysis: antigen expression defect in vitro / C. Giordano, R. de Maria, M. Todaro et al. // *J. Clin. Immunol.* – 1993. – Vol. 13, N 1. – P. 68–78.
679. Su, X. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes / X. Su, Q. Hu, J.M. Kristan // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 2523–2532.
680. Suarez-Pinzon, W.L. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta-cells in nonobese diabetic mice / W.L. Suarez-Pinzon, R.F. Power, A. Rabinovitch // *Diabetologia*. – 2000. – Vol. 43. – P. 1149–1156.
681. Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus / K. Buschard, K. Josefsen, T. Horn, P. Fredman // *Lancet*. – 1993. – Vol. 342. – P. 840.
682. Suppression and acceleration of autoimmune diabetes by neutralization of endogenous interleukin-12 in NOD mice / K. Fujihira, M. Nagata, H. Moriyama et al. // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49. – P. 1998–2006.
683. Suppression of diabetes in non-obese diabetic mice by oral administration of porcine insulin / Z.J. Zhang, L. Davidson, G. Eisenbarth, H.L. Weiner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – Vol. 88. – P. 10252–10256.
684. Suppressive effect of glutamic acid decarboxylase 65-specific autoimmune B lymphocytes on processing of T cell determinants located within the antibody epitope / J.C. Jaume, S.L. Parry, A.M. Madec et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, N 2. – P. 665–672.
685. Suppressor of cytokine signaling-1 overexpression protects pancreatic B-cells from CD8+ T-cell-mediated autoimmune destruction / M.W. Chong, Y. Chen, R. Darwiche et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 5714–5721.
686. Swain, M. Autoimmune thyroid disorders – an update / M. Swain, T. Swain, B.K. Mohanty // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2005. – Vol. 20, N 1. – P. 9–17.

687. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- $\gamma$  gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN- $\gamma$  promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1 / M. Nakahira, H.J. Ahn, W.R. Park et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 1146–1153.
688. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice / Y. Oikawa, A. Shimada, A. Kasuga et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171, N 11. – P. 5865–5875.
689. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease / B.A. Kallmann, M. Huther, M. Tubes et al. // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46. – P. 237–243.
690. T cell-positive antibody-negative” phenotypic type 2 patients, a unique subgroup of autoimmune diabetes / H. Ismail, M. Wotring, C. Kimmie et al. // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56, suppl. 1. – A. 325.
691. T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children / R. Abulafia-Lapid, D. Gillis, O. Yosef et al. // *J. Autoimmun.* – 2003. – Vol. 20. – P. 313–321.
692. T helper 1 profile of recently activated circulating T cells in type 1 diabetes / N.J. Leech, K.A. Elsegood, P. Narendran et al. // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42, suppl. 1. – A. 316.
693. Tandon, N. Expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in autoimmune thyroid disease / N. Tandon, R.A. Metcalfe, D. Barnett // *Q. J. Med.* – 1994. – Vol. 87. – P. 231–236.
694. Tang, H. The effects of a monoclonal antibody to interferon-gamma on experimental autoimmune thyroiditis (EAT): prevention of disease and decrease of EAT-specific T cells / H. Tang, P.L. Meroni // *Eur. J. Immunol.* – 1993. – Vol. 23. – P. 275–278.
695. Tang, Q. Regulatory T-cell Control of Autoimmune Diabetes and Their Potential Therapeutic Application / Q. Tang, J.A. Bluestone // *Regulatory T Cells and Clinical Application* / ed. S. Jiang. – New York: Springer Science + Business Media, LLC, 2008. – P. 199–230.
696. Taniguchi, T. Association of Rapid Onset Type 1 Diabetes and Clinical Acute Pancreatitis Positive for Autoantibodies to the Exocrine Pancreas / T. Taniguchi // *Diabetes Care.* – 2001. – Vol. 24, N 12. P. 2156–2157.
697. Taplin, C.E. Autoantibodies in type 1 diabetes / C.E. Taplin, J.M. Barker, B. Davis // *Autoimmunity.* – 2008. – Vol. 41, N 1. – P. 11–18.

698. T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins / B.O. Roep, S.D. Arden, R.R. de Vries, J.C. Hutton // *Nature*. – 1990. – Vol. 345, N 6276. – P. 632–634.
699. T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes / C.J. Hawkes, N.C. Schloot, J. Marks et al. // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49, N 3. – P. 356–366.
700. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T-cells / M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins et al. // *Immunity*. – 2006. – Vol. 24. – P. 179–189.
701. Th/Th2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients / M.J. Rapoport, T. Bistritzer, D. Aharoni et al. // *Cytokine*. – 2005. – Vol. 30, N 5. – P. 219–227.
702. Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408 / A. Szebeni, N. Schloot, V. Kecskemeti et al. // *Inflamm. Res.* – 2005. – Vol. 54, N 10. – P. 415–419.
703. Th1 to Th2 cytokine shifts in NOD mice: sometimes an outcome, rather than the cause of diabetes resistance elicited by immunostimulation / D.V. Serreze, H.D. Chapman, C.M. Post et al. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 1352–1359.
704. TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients / M.J. Rapoport, T. Bistritzer, D. Aharoni et al. // *Cytokine*. – 2005. – Vol. 30, N 5. – P. 219–227.
705. Th2 dominance of T helper cell response to preproinsulin in individuals with preclinical type 1 diabetes / I. Durinovic-Bello, M. Riedl, S. Rosinger et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 958. – P. 209–213.
706. The autoimmunity-related GIMAP5 GTPase is a lysosome-associated protein / V. Wong, A.E. Saunders, A. Hutchings et al. // *Self Nonself*. – 2010. – N 1. – P. 259–268.
707. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes / J.M. Wenzlau, K. Juhl, L. Yu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 17040–17045.
708. The CD4(+) regulatory T-cells is decreased in adults with latent autoimmune diabetes / Z. Yang, Z. Zhou, G. Huang et al. // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2007. – Vol. 76. – P. 126–131.
709. The clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in adults and its relation with chronic complications in metabolically poor controlled Turkish

- patients with Type 2 diabetes mellitus / E. Arikan, T. Sabuncu, E.M. Ozer et al. // *J. Diabetes Complications*. – 2005. – Vol. 19, N 5. – P. 254–258.
710. *The Cytokine Handbook* / ed. A.W. Thomson, M.T. Lotze. – London: Elsevier Science Ltd., 2003. – 1396 p.
711. The Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study Group: Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes / J.P. Krischer, D.D. Cuthbertson, L. Yu et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* – 2003. – Vol. 88. – P. 103–108.
712. The effects of thyroid hormones on circulating markers of cell-mediated immune response, as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma before and during thyroxine withdrawal / J. I. Botella-Carretero, A. Prados, L. Manzano et al. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 153. – P. 223–230.
713. The EURODIAB IDDM Complications Study Group : Relationship Between Plasma Sialic Acid Concentration and Microvascular and Macrovascular Complications in Type 1 Diabetes / M.A. Crook, J.C. Pickup, P.J. Lumb et al. // *Diabetes Care*. – 2001. – Vol. 24. – P. 316–322.
714. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus // *Diabetes Care*. – 1997. – Vol. 20. – P. 1183–1197.
715. The glutamic acid decarboxylase 65 immunoglobulin G subclass profile differs between adult-onset type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults (LADA) up to 3 years after clinical onset / M. Hillman, C. Torn, M. Landin-Olsson et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2009. – Vol. 157. – P. 255–260.
716. The involvement of human tumor necrosis factors-alpha and -beta in the mixed lymphocyte reaction / M.R. Shalaby, T. Espevik, G.C. Rice et al. // *J. Immunol.* – 1988. – Vol. 141. – P. 499–503.
717. The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity / K. Shudo, K. Kinoshita, R. Imamura et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – P. 2504–2511.
718. The molecular interaction of Fas and FAP-1: a tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis / J. Yanagisawa, M. Takahashi, H. Kanki et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 8539–8545.
719. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity / R.M. Siegel, F.K. Chan, H.J. Chun et al. // *Nat. Immunol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 469–474.

720. The occurrence of thyrotropin binding-inhibiting immunoglobulins and thyroid-stimulating antibodies in patients with silent thyroiditis / T. Morita, H. Tamai, A. Oshima et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1990. – Vol. 71, N 4. – P. 1051–1055.
721. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset / A. Saoudi, B. Seddon, V. Heath, D. Fowell // *Immunol. Rev.* – 1996. – Vol. 149. – P. 195–216.
722. The relationship between thyroid function, serum monokine induced by interferon gamma and soluble interleukin-2 receptor in thyroid autoimmune diseases / J. Jiskra, M. Antosova, Z. Limanova et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 156. – P. 211–216.
723. The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T-cell activation and survival / D.R. Beisner, I.H. Chu, A.F. Arechiga et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 247–256.
724. The role of 2FOXP3 isoforms in the generation of humanCD4+Tregs / S.E. Allan, L. Passerini, R. Bacchetta et al. // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 3276–3284.
725. The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets / A.I. Roberts, S. Devadas, X. Zhang et al. // *Immunol. Res.* – 2003. – Vol. 28. – P. 285–293.
726. The role of CD1d-restricted NK T lymphocytes in the immune response to oral infection with *Salmonella typhimurium* / E. Berntman, J. Rolf, C. Johansson et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – Vol. 35, N 7. – P. 2100–2109.
727. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis / A. Krueger, S.C. Fas, S. Baumann, P.H. Krammer // *Immunol. Rev.* – 2003. – Vol. 193. – P. 58–69.
728. The role of Fas in autoimmune diabetes / A.V. Chervonsky, Y. Wang, F.S. Wong et al. // *Cell.* – 1997. – Vol. 89. – P. 17–24.
729. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice / H.-S. Jun, C.-S. Yoon, L. Zbytnuik et al. // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189. – P. 347–358.
730. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation / L.F. Lee, B. Xu, S.A. Michie et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Vol. 102, N 44. – P. 15995–6000.
731. Thyrocyte proliferation by cellular adhesion to infiltrating lymphocytes through the intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated



- antigen-1 pathway in Graves disease / T. Arao, I. Morimoto, A. Karinuma et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 382–389.
732. Thyroglobulin autoantibodies in iodized subjects: relationship between epitope specificities and longitudinal antibody activity / O.E. Okosieme, L.D. Premawardhana, A. Jayasinghe et al. // *Thyroid.* – 2005. – Vol. 15, N 9. – P. 1067–1072.
733. Thyroglobulin peptides of specific primary hormonogenic sites can generate cytotoxic T cells and serve as target autoantigens in experimental autoimmune thyroiditis / Q. Wan, D.J. McCormick, C.S. David, Y.C. Kong // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1998. – Vol. 86. – P. 110–114.
734. Thyroglobulin: current aspects of its role in autoimmune thyroid disease and thyroid cancer / O.E. Okosieme, A.B. Parkes, L.D. Premawardhana et al. // *Minerva Med.* – 2003. – Vol. 94, N 5. – P. 319–330.
735. Thyroid autoimmunity in children with features of both type 1 and type 2 diabetes / I.M. Libman, K. Sun, T.P. Foley, D.J. Becker // *Pediatr. Diabetes.* – 2008. – Vol. 9. – P. 266–271.
736. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro / A. Kawakami, K. Eguchi, N. Matsuoka et al. // *Endocrinology.* – 1996. – Vol. 137. – P. 3163–3169.
737. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 facilitates Fas-mediated neuronal cell death following mild ischemia / M. Wetzel, L. Li, K.M. Harms et al. // *Cell. Death. Differ.* – 2007. – Vol. 15. – P. 143–151.
738. Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) / T. Lohmann, K. Kellner, H.J. Verlohren et al. // *Diabetologia.* – 2001. – Vol. 44. – P. 1005–1010.
739. TNF gene polymorphisms in Graves' disease: TNF-308 A/G meta-analysis / M. Kammoun-Krichen, N. Bougacha-Elleuch, A. Rebai et al. // *Ann. Hum. Biol.* – 2008. – Vol. 35, N 6. – P. 656–661.
740. TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patients after stimulation with alginate and lipopolysaccharide / B. Kulseng, G. Skjak-Braek, I. Folling et al. // *Scand. J. Immunol.* – 1996. – Vol. 43, N 3. – P. 335–340.
741. TNF receptor 1 (TNFR1) and CD95 are not required for T cell deletion after virus infection but contribute to peptide-induced deletion under limited conditions / L.T. Nguyen, K. McKall-Faienza, A. Zakarian et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – Vol. 30. – P. 683–688.

742. TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-10, IL-6, gene polymorphisms in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes mellitus / A. Tsiavou, E. Hatziagelaki, A. Chaidaroglou et al. // J. Clin. – Immunol. – 2004. – Vol. 24, N 6. – P. 591–599.
743. TNF- $\alpha$  RII in relation to type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults / C. Torn, M. Hillman, C.B. Sanjeevi et al. // Diabetologia. – 2003. – Vol. 46, suppl. 2. – A. 108.
744. To B or not to B-pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes / F.S. Wong, C. Hu, Y. Xiang, L. Wen // Curr. Opin. Immunol. – 2010. – Vol. 22. – P. 723–731.
745. Todaro, M. Role of apoptosis in autoimmunity / M. Todaro, A. Zeuner, G. Stassi // J. Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 24. – P. 1–11.
746. Tomer, Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future / Y. Tomer // Thyroid. – 2010. – Vol. 20, N 7. – P. 715–725.
747. Tomoda, T. Imbalance of the interleukin 2 system in children with IDDM / T. Tomoda, T. Kurashige, T. Taniguchi // Diabetologia. – 1994. – Vol. 37, N 5. – P. 476–482.
748. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA identical siblings by bone marrow transplantation / E.F. Lampeter, M. Homberg, K. Quabeck et al. // Lancet. – 1993. – Vol. 341. – P. 1243–1244.
749. Transfer of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus associated autoimmunity to mice with severe combined immunodeficiency (SCID) / J.S. Petersen, M.O. Marshall, S. Baekkeskov S. et al. // Diabetologia. – 1993. – Vol. 36. – P. 510–515.
750. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice / C.Y. Hu, D. Rodriguez-Pinto, W. Du et al. // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117. – P. 3857–3867.
751. Trifnrescu, R. Autoimmune thyroid disease--a continuous spectrum / R. Trifnrescu, C. Poianr, D. Hortopan // Rom. J. Intern. Med. – 2008. – Vol. 46, N 4. – P. 361–365.
752. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1\*1502-DQB1\*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies / H. Obayashi, G. Hasegawa, M. Fukui et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2000. – Vol. 85. – P. 3348–3351.
753. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line / C.

- Huang, R. Nazarian, J. Lee et al. // *Int. J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 20. – P. 289.
754. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo / D.E. Speiser, E. Sebzda, T. Ohteki et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – Vol. 26. – P. 3055–3060.
755. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in diabetic plasma increases the activity of core 2 GlcNAc-T and adherence of human leukocytes to retinal endothelial cells: significance of core 2 GlcNAc-T in diabetic retinopathy / B.M. Ben-Mahmud, G.E. Mann, A.Datti et al. // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, N 11. – P. 2968–2976.
756. Tuomi, T. LADA: is it distinct from type 1 diabetes? / T. Tuomi, M. Andersen, V. Lundgren // *Int. Diabetes.* – 2010. – Vol. 22. – P. 128–131.
757. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene / D.F. Bu, M.G. Erlander, B.C. Hitz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89, N 6. – P. 2115–2119.
758. Type 1 diabetes mellitus: an inflammatory disease of the islet / R. Bergholdt, P. Heding, K. Nielsen et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2004. – Vol. 552. – P. 129–153.
759. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype / H.Y. Qin, J.L. Mahon, M.A. Atkinson et al. // *J. Autoimmun.* – 2003. – Vol. 20. – P. 237–245.
760. Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults (LADA): one end of the rainbow / R.D. Leslie, R. Williams, P. Pozzilli et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, N 5. – P. 1654–1659.
761. Type I (insulin-dependent) diabetes is a Th1- and Th2-mediated autoimmune disease / S.T. Azar, H. Tamim, H.N. Beyhum et al. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 306–310.
762. Ueno, H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase / H. Ueno // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2000. – Vol. 10. – P. 67–79.
763. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes: UK Prospective Diabetes Study Group / R. Turner, I. Stratton, V. Horton et al. // *Lancet.* – 1997. – Vol. 350, N 9087. – P. 1288–1293.
764. Unequal death in T helper (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis / X. Zhang, T. Brunner, L. Carter et al. // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 185. – P. 1837–1849.

765. Unique epitopes of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in slowly progressive and acute-onset type 1 diabetes / T. Kobayashi, S. Tanaka, M. Okubo et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88. – P. 4768–4775.
766. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in T-cells from patients with Type 1 diabetes / P. Richiusa, G. Pizzolanti, G. Misiano et al. // *Diabetes Nutr. Metab.* – 2004. – Vol. 17. – P. 6–11.
767. Urinary albumin excretion in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is more similar to type 2 than type 1 diabetes : Results of the Nord-Trondelag Health Study 1995–1997 / M.A. Radtke, T.I. Lund Nilsen, K. Midthjell, V. Grill // *Diabetes&Metabolism.* – 2009. – Vol. 35. – P. 273–279.
768. Validity of screening for individuals at risk for Type I diabetes by combined analysis of autoantibodies to recombinant proteins / M. Christie, U. Roll, M. Payton et al. // *Diabetes Care.* – 1997. – Vol. 20. – P. 965–970.
769. Variable number of tandem repeats of the insulin gene determines susceptibility to latent autoimmune diabetes in adults / G.E. Cerrone, M. Caputo, A.P. Lopez et al. // *Mol. Diagn.* – 2004. – Vol. 8, N 1. – P. 43–49.
770. Vassart, G. The thyrotropin receptor and the regulation of thyroid function and growth / G. Vassart, J.E. Dumont // *Endocrine Rev.* – 1992. – Vol. 13. – P. 596–611.
771. Vendrame, F. Markers of beta cell function in type 1 diabetes mellitus / F. Vendrame, A. Zappaterreno, F. Dotta // *Minerva Med.* – 2004. – Vol. 95. – P. 79–84.
772. Vendrame, F. Prediabetes: prediction and prevention trials / F. Vendrame, P.A. Gottlieb // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 2004. – Vol. 33, N 1. – P. 75–92.
773. Very slow turnover of beta cells in aged adult mice / M. Teta, S.Y. Long, L.M. Wartschow et al. // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 2557–2567.
774. Volpe, R. The pathology of thyroiditis / R. Volpe // *Hum. Pathol.* – 1978. – Vol. 9. – P. 429–438.
775. Vujanovic, N.L. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity / N.L. Vujanovic // *Immunol. Res.* – 2011. – Vol. 50. – P. 159–174.
776. Wajant, H. Tumor necrosis factor signaling / H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // *Cell. Death. Differ.* – 2003. – Vol. 10. – P. 45–65.
777. Waldron-Lynch, F. Advances in type 1 diabetes therapeutics: Immunomodulation and B-cell salvage / F. Waldron-Lynch, K.C. Herold // *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* – 2009. – Vol. 38. – P. 303–317.

778. Wang, H.C. Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor / H.C. Wang, J.R. Klein // *Crit. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 21, N 4. – P. 323–337.
779. Wasmeier, C. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes / C. Wasmeier, J.C. Hutton // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, N 30. – P. 18161–18170.
780. Watling, K.J. Receptor classification and signal transduction / K.J. Watling. – Natick, USA, 2006. – 416 p.
781. Weckmann, A.L. Cytokine inhibitors in autoimmune disease / A.L. Weckmann, J. Acocer-Varela // *Semin Arthritis Rheum.* – 1996. – Vol. 26, N 2. – P. 539–557.
782. Weetman, A.P. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease / A.P. Weetman // *Clin. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 61 – P. 405–413.
783. Weetman, A.P. Cytokines and autoimmune thyroid disease / A.P. Weetman, R.A. Ajjan // *Hot thyroidology* ([www.hotthyroidology.com](http://www.hotthyroidology.com)). 2002. N. 1.
784. Weetman, A.P. Thyroid Abnormalities / A.P. Weetman // *Endocrinol Metab Clin North Am.* – 2014. – Vol. 43(3). – P. 781-790.
785. Wendling, U. Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells / U. Wendling // *Cell Death Diff.* – 2000. – Vol. 7. – P. 637–644.
786. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes / Z. Chen, A.E. Herman, M. Matos et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P. 1387–1397.
787. Wilkin, T.J. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes / T.J. Wilkin // *Diabetologia.* – 2001. – Vol. 44. – P. 914–922.
788. Wilkin, T.J. The primary lesion theory of autoimmunity: a speculative hypothesis / T.J. Wilkin // *Autoimmunity.* – 1990. – Vol. 7. – P. 225–235.
789. Williams, J.P. Immune-Mediated Inflammatory Disorders (I.M.I.D.s): The Economic and Clinical Costs / J.P. Williams, J.A. Meyers // *Am. J. Manag. Care.* – 2002. – Vol. 8. – P. S664–S681.
790. Wogensen, L. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans / L. Wogensen, X. Huang, N. Sarvetnick // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178. – P. 175–185.
791. Wogensen, L. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of  $\beta$  -cells in nonobese diabetic mice / L.

- Wogensen, M.-S. Lee, N. Sarvetnick // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 1379–1384.
792. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes—the analysis of the data on published incidence trends / P. Onkamo, S. Vaananen, M. Karvonen et al. // *Diabetologia.* – 1999. – Vol. 42. – P. 1395–1403.
793. Wormald, S. Inhibitors of cytokine signal transduction / S. Wormald, D. Hilton // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 821–824.
794. Xie, H. IA-2, a transmembrane protein tyrosine phosphatase, is expressed in human lung cancer cell lines with neuroendocrine phenotype / H. Xie, A.L. Notkins, M.S. Lan // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56, N 12. – P. 2742–2744.
795. Yadav, U.C. Understanding the role of aldose reductase in ocular inflammation / U.C. Yadav, S.K. Srivastava, K.V. Ramana // *Curr. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 10. – P. 540–549.
796. Yang, Z. Decrease of FOXP3 mRNA in CD4+ T cells in latent autoimmune diabetes in adult / Z. Yang, Z. Zhou, W.L. Tang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2006. – Vol. 86. – P. 2533–2536.
797. Yoon, J.W. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells / J.W. Yoon, H.S. Jun // *Am. J. Ther.* – 2005. – Vol. 12, N 6. – P 580–591.
798. Zamai, L. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells / L. Zamai // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 188. – P. 2375–2380.
799. Zhang, B. Autoantibodies to IA-2 in IDDM: location of major antigenic determinants / B. Zhang, M.S. Lan, A.L. Notkins // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46, N 1. – P. 40–43.
800. Zheng, S.J. TRAIL, Bim, and thymic-negative selection / S.L. Zheng, Y.H. Chen // *Immunol. Res.* – 2003. – Vol. 28. – P. 295–301.
801. Zimmet, P.Z. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults: Genes, autoimmunity, and demography / P.Z. Zimmet // *Diabetes Care.* – 1995. – Vol. 18. – P. 1050–1064.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Обобщение полученных иммунологических данных относительно риска индукции, прогрессирования и хронизации аутоиммунного сахарного диабета

(заштриховано – показатель, вошедший как значимый для дискриминационной функции между СД 1 и LADA)

Фактор, система «лиганд- рецептор»цитокина	СД1	LADA	Функциональный эффект	Влияние на риск индукции, прогрессирования и хронизации аутоиммунного сахарного диабета
субпопуляционный состав лимфоцитов	лимфопения за счет снижения CD8+ и <b>CD16+CD56<sup>low</sup></b> клеток	более выраженная лимфопения за счет снижения CD8+ и <b>CD16+CD56<sup>low</sup></b> клеток	снижение параметров врожденного иммунитета, снижение устойчивости к лимфотропным вирусным инфекциям	большая предрасположенность к индукции аутоиммунных заболеваний при LADA, косвенное доказательство – увеличение процента лиц с АИТ (32%) против 5% у лиц с СД1 манифестного течения
	лимфопения за счет снижения <b>CD8+</b> и CD16+CD56 <sup>low</sup> клеток	более выраженная лимфопения за счет снижения <b>CD8+</b> и CD16+CD56 <sup>low</sup> клеток	CD8+-лимфоциты: цитотоксические (ЦТЛ) и эффекторные	<ul style="list-style-type: none"> <li>ограничение ЦТЛ-опосредованных реакций в органе-мишени,</li> <li>ограничение аутоиммунного инсулита</li> </ul>
	норма	относительное уменьшение количества В- лимфоцитов	В-клетки, являясь АПК, играют важную роль на этапе индукции аутоиммунного инсулита; хронизация аутоиммунного инсулита за счет антителопродукции	<ul style="list-style-type: none"> <li>меньшее участие В-клеток в качестве АПК на этапе индукции аутоиммунного инсулита (?)</li> <li>перераспределение коммитированных В-клеток в орган- мишень и поддержание гуморальной фазы патологического иммунного ответа на собственные АГ- продукция ауто-антител</li> </ul>
<b>IL-2, количество CD25+- лимфоцитов</b>	повышена базальная продукция	повышена базальная и стимулированная	дифференцировка и поддержание периферического пула	плейотропность действия цитокина на отдельные звенья иммунопатогенеза, но с учетом положительной

		продукция	<p><math>T_{reg}</math> лимфоцитов неспецифический фактор роста (Т-, В, NK-клетки, моноциты, макрофаги);</p> <p>сдвиг пролиферации хелперных лимфоцитов в сторону Th1 дифференцировки</p> <p>формирование популяции Т-клеток памяти</p> <p>усиление цитотоксических свойств CD8+лимфоцитов, стимуляция синтеза антител В-лимфоцитами</p>	<p>корреляционной связи с уровнем эндогенной секреции инсулина (С-пептид), возможно, преобладание эффектов цитокина на поддержание периферического пула регуляторных Т-лимфоцитов и протективных эффектов относительно риска индукции и прогрессирования аутоиммунного инсулита</p>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	продукция повышена	продукция повышена	<p>цитокин Th1-лимфоцитов, привлечение АПК, подавление функции Th2-лимфоцитов</p>	<p>система одинаково активирована при СД1 и LADA, приводит к индукции и прогрессированию аутоиммунного инсулита, участвует в деструктивной фазе совместно с IL-1<math>\beta</math> и TNF-<math>\alpha</math></p>
<b>IL-10</b>	повышение базальной и стимулированной секреции	резкое повышение базальной и стимулированной секреции	<p>тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и аутоантигены; подавляет продукцию IFN-<math>\gamma</math> Th1 лимфоцитами</p>	<p>протективный эффект на развитие аутоиммунного инсулита, опосредованный через подавление продукции основных провоспалительных цитокинов, участвующих в деструктивной фазе аутоиммунного инсулита</p>





			связывание с мембранными рецепторами усиление и пролонгирование действие TNF- $\alpha$	деструктивную фазу аутоиммунного инсулита при LADA
<b>Fas (CD95+)</b>	норма	повышение количества CD95+лимфоцитов	делеция аутореактивных T-клеток является CD95-опосредуемой  Участие Fas-опосредуемого апоптоза в механизмах гибели $\beta$ -клетки	при LADA вероятно, способствуют элиминации Th1-клеток из циркуляции вследствие Fas/FasL-опосредованного апоптоза (Th2-клетки устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу)
<b>Fas-L (CD95-L)</b>	повышено	повышено относительно CD1	FasL-несущие лимфоциты способны индуцировать гибель $\beta$ -клетки через активацию Fas/FasL-опосредованного апоптоза, однако по данным экспериментальных исследований этот механизм гибели инсулинпродуцирующей паренхимы не является ведущим.	
<b>sFas-L</b>	повышено	повышено относительно CD1	способствует элиминации T-	элиминация аутореактивных T-лимфоцитов памяти может ограничивать

			лимфоцитов памяти (CD45RB <sup>low</sup> ) из циркуляции	хронизацию аутоиммунного инсулита
<b>продолжение табл. 58</b>				
Обобщение полученных иммунологических данных относительно риска индукции, прогрессирования и хронизации, а также клинических особенностей аутоиммунных тиреопатий (болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит) (заштриховано – показатели, вошедшие как значимые для дискриминационной функции между БГ и АИТ)				
Фактор, система цитокина	БГ	АИТ	Функциональный эффект	Влияние на риск индукции, прогрессирования и хронизации аутоиммунных тиреопатий
субпопуляционный состав лимфоцитов	лимфопения за счет дефицита НК-клеток	лимфопения за счет дефицита НК-клеток-более выражено, чем у пациентов с БГ	снижение параметров врожденного иммунитета, снижение устойчивости к лимфотропным вирусным инфекциям	потеря иммунологического контроля над аутореактивными клонами лимфоцитов и их выживание, значимый фактор на этапе индукции органоспецифического аутоиммунного воспаления
		повышение количества Т-хелперных лимфоцитов (CD4+), цитотоксических лимфоцитов (CD8+) относительно группы контроля и пациентов с БГ	CD8+-лимфоциты: цитотоксические (ЦТЛ) и эффекторные	<ul style="list-style-type: none"> <li>• усиление ЦТЛ-опосредованных реакций в органе-мишени,</li> <li>• усиление деструктивной фазы воспаления при АИТ</li> </ul>
			CD4+лимфоциты (хелперные)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• конечный результат зависит от «Th1/Th2/Th3 –репертуара» хелперных лимфоцитов</li> <li>• может свидетельствовать о большем функциональном напряжении клеточно-опосредованных реакций при АИТ, чем при БГ (Th1-поляризация)</li> </ul>

		увеличение количества В-лимфоцитов относительно группы контроля и БГ	активация гуморального звена иммунитета	может отражать Т-зависимый механизм В-клеточной пролиферации и активации (Th2-поляризацию иммунного ответа
IL-2, количество CD25+-лимфоцитов	повышение продукции IL-2 в фазе гипертиреоза	снижение продукции IL-2 в фазе гипотиреоза	дифференцировка и поддержание периферического пула T <sub>reg</sub> лимфоцитов неспецифический фактор роста (Т-, В, NK-клетки, моноциты, макрофаги); сдвиг пролиферации хелперных лимфоцитов в сторону Th1 дифференцировки формирование популяции Т-клеток памяти усиление цитотоксических свойств CD8+лимфоцитов, стимуляция синтеза антител В-лимфоцитами	продукция IL-2 при АИТП зависела только от уровня тиреоидных гормонов (от функционального состояния ЩЖ)
	уменьшение количества CD25+-несущих лимфоцитов	норма		отражает снижение IL-2-зависимого пути активации клеточного иммунитета, может ограничивать Th1-поляризацию клеточного иммунитета при БГ
	При всех изучаемых вариантах АИТП и при неиммунных вариантах тиреопатий (коллоидный зоб) иммуногистохимически фиксировалась экспрессия рецептора к IL-2 (CD25+) фолликулярным эпителием, в коллоиде и клетками лимфоплазмочитарной инфильтрации и мигрирующими в паренхиму ЩЖ макрофагами. Выраженность экспрессии рецептора к IL-2 коррелировала с выраженностью пролиферативных процессов в ЩЖ, независимо от нозологического варианта.			Выраженность экспрессии рецептора к IL-2 коррелировала с выраженностью пролиферативных процессов в ЩЖ, независимо от нозологического варианта АИТП
IL-4, количество	увеличение	увеличение	формирование	повышение количества CD124+-

<b>CD124+-лимфоцитов</b>	количества CD124+-несущих лимфоцитов	количества CD124+-несущих лимфоцитов	<p>«толерантного» Th2-фенотипа за счет подавления дифференцировки Th1-лимфоцитов</p> <p>IL-4 усиливает опосредованный Th2 клетками гуморальный иммунный ответ</p> <p>снижает АТ-зависимую цитотоксичность и АТ-зависимый фагоцитоз</p> <p>IL-4 может оказывать противовоспалительное действие путем депрессии транскрипции генов и усиления деградации мРНК-цитокинов с провоспалительными свойствами</p> <p>стимулирующее влияние IL-4 на пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов in vivo</p>	<p>лимфоцитов при АИТ может расцениваться как фактор, способствующий наработке аутоантител к структурам фолликулярного эпителия, с одной стороны, и как фактор, ограничивающий провоспалительное действие цитокинов Th1-профиля, с другой стороны.</p> <p><b>суммарные эффекты при АИТ:</b> усиление Th1 и Th2-зависимых реакций</p> <p><b>суммарные эффекты при БГ:</b> преимущественно Th2-иммунное отклонение</p>
	Максимальная			Экспрессия рецептора к IL-4 не является

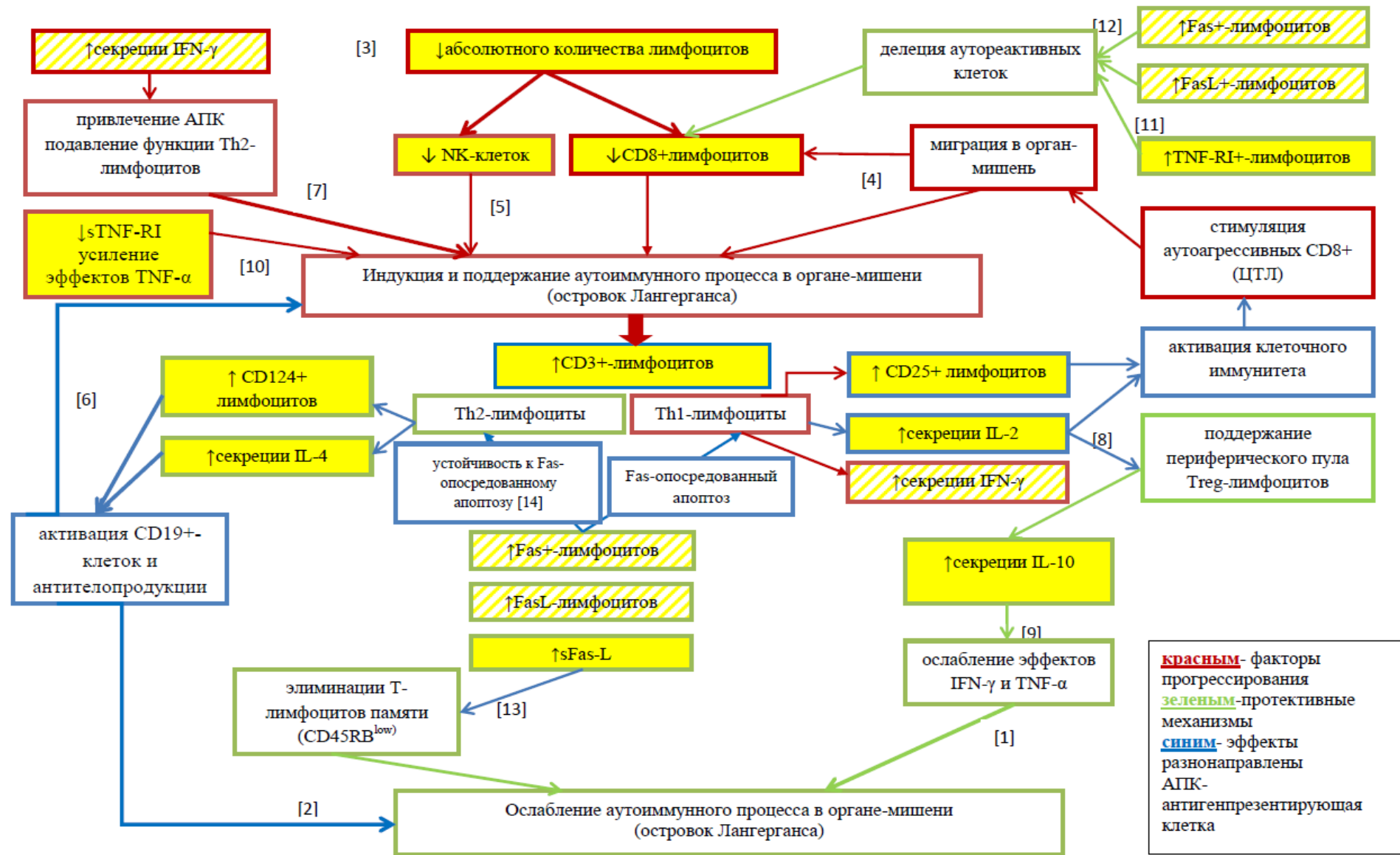
<p><b>детекция CD124+ в паренхиме ЩЖ</b></p>	<p>экспрессия CD124+ наблюдалась при 1 и 2-м гистологических вариантах БГ, минимальная при БГ с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия (3 вариант). В этих случаях и инфильтрирующие ткань железы лейкоциты экспрессировали рецептор к IL-4 слабо.</p>			<p>специфичной для конкретного варианта тиреопатий, так как фиксировалась во всех случаях, мало коррелировала с клиническими проявлениями заболевания, такими как объем ЩЖ, возраст, пол, склонность к узлообразованию, стаж заболевания и тд.</p> <p>Тем не менее, более выраженная экспрессия CD124+ при 1 и 2 вариантах БГ отражает свойственное для активной БГ Th2-иммунное отклонение</p>
<p><b>TNF-<math>\alpha</math></b></p>	<p><b>снижение спонтанной и стимулированной продукции TNF-<math>\alpha</math> независимо от фазы</b></p>	<p><b>снижение спонтанной и стимулированной продукции TNF-<math>\alpha</math> независимо от фазы</b></p>	<p>вызывает абберантную экспрессию молекул адгезии и антигенов гистосовместимости (HLA) II класса на поверхности фолликулярного эпителия ЩЖ</p> <p>участие в рецепторном пути апоптоза ИКК (гибель</p>	<p>угнетение системы «лиганд-рецептор» фактора некроза опухолей <math>\alpha</math> при аутоиммунных тиреопатиях</p> <p>С учетом результатов иммуногистохимической детекции TNF-RI и данных субанализа (по гистологическим вариантам БГ) можно сделать вывод о <b>менее выраженном ингибировании системы цитокина и его рецепторов</b> в иммунопатогенезе АИТ, нежели БГ.</p>
	<p>уменьшение количества лимфоцитов, несущих TNF-RI</p>	<p>уменьшение количества лимфоцитов, несущих TNF-RI</p>		

**иммуногистохимическая  
детекция TNF-RI  
паренхиме ЩЖ**

		<p>аутореактивных CD8+лимфоцитов, но не CD4+)</p> <p>угнетение пролиферации тиреоцитов и ингибирование NIS/захвата йода, что может приводить к гипотиреозу</p>	
<p>невыраженная при 1 и 2-м гистологическом варианте, появление клеток моноцитарно-макрофагальной морфологии, экспрессирующих маркер при онкоцитарной трансформации тироидного эпителия и «мягком» клиническом течении БГ (3-1 гистологический вариант)</p>	<p>максимально выражена при АИТ на клетках моноцитарно-макрофагальной морфологии</p>	<p>Было показано, что источником экспрессии рецептора к TNF-<math>\alpha</math> являются только иммуноциты, инфильтрирующие ткань ЩЖ. Кроме того, не все клетки, представляющие инфильтрат одинаково экспрессируют TNF-RI, а лишь клетки, имеющие моноцитарно-макрофагальную морфологию. Степень выраженности инфильтрации, экспрессирующей TNF-</p>	

<b>sTNF-RI</b>			RI сильно варьировалась, как при БГ, так и при АИТ, не наблюдаясь при неиммунных тиреопатиях (коллоидный пролиферирующий зоб).	
	снижение концентрации sTNF-RI в кондиционных средах	снижение концентрации sTNF-RI в кондиционных средах	антагонист (ингибитор) TNF- $\alpha$ , напрямую блокирует действие цитокина или конкурирует за связывание с мембранными рецепторами;  усиление и пролонгирование действие TNF- $\alpha$	

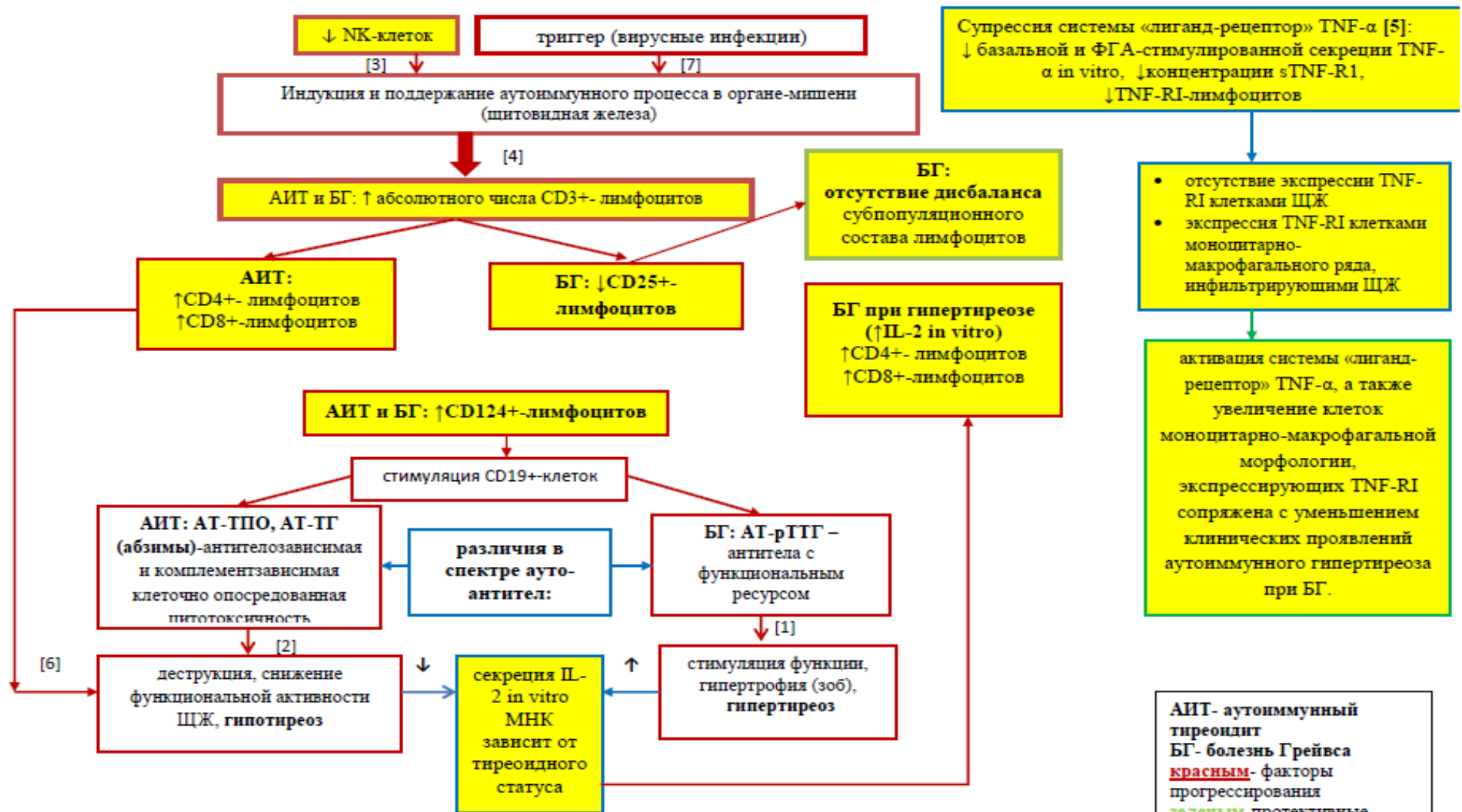




**Приложение 2.** Участие иммунных механизмов в формировании аутоиммунного повреждения β-клеток островка Лангерганса и возможные механизмы ослабления аутоиммунного повреждения при латентном аутоиммунном сахарном диабете (LADA); **желтым цветом** выделены результаты собственных исследований, пунктирный желтый – повторяющиеся блоки на схеме

## Литературные ссылки к приложению 2:

- 1) Rabinovitch A., 2003; Bruun C. et al., 2005; Chen M. et al., 2005;; Chang Y. et al., 2005
- 2) Зак К.П., Попова В.В., 2006; Симбирцев А.С., 2002, 2004
- 3) Poussier P. et al., 2005; Schulteis R.D. et al., 2008; Wong V. et al., 2010
- 4) Lieberman S.M. et al., 2003; Dogan Y. et al., 2006
- 5) Berntman E, Rolf J, Johansson C, Anderson P, Cardell SL., 2005
- 6) Noorchashm H, 1999; Hulbert C, 2001; Hu CY, Rodriguez-Pinto D, DuW, 2007; Pescovitz MD, Greenbaum CJ, 2009; Roberto Mallone, Vedran Brezar, 2011
- 7) Chen M., 2005; Storling I., 2005; Bruun C., 2009
- 8) R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, S. Sakaguchi, 2005
- 9) Leech N. J., Elsegood K. A., Narendran P., 1999; Rapaport M.J., Bistrizter T., Aharoni D., 2005; BonatoV., Dionisi S., Vendrame F., 2005
- 10) Bruun C., Heding P.E., Ronn S.G., 2009; Ortis F., Pirot P., Naamane N. et al., 2008; Ortis F., Naamane N., Flamez D. et al., 2010
- 11) Ban L., Zhang J., Wang L., Kuhlreiber W. et al., 2008
- 12) Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003
- 13) Потапнев М.П., 2002; Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003; Todaro M., Zeuner A., Stassi G., 2004
- 14) Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H., 2003; Roberts A. I., Devadas S., Zhang X., 2003; Fas S. C., Fritzsching B., Suri-Payer E., Krammer P. H., 2006



Приложение 3. Участие иммунных механизмов в формировании аутоиммунных тиреопатий; желтым цветом выделены результаты собственных исследований

**Литературные ссылки к приложению 3:**

- 1) Исаева М.А. и соавт., 2007; Anvari M. et al., 2010
- 2) Кандроп В.И., 2006; Исаева М.А. и соавт., 2007; Андреева А.В. и соавт., 2011
- 3) Wenzel B. et al., 1998; Fort M.M. et al., 1998; Solerte S.B. 2005; Liu R. et al., 2006
- 4) Stassi G., 2002; Swain M. et al., 2005; Кандроп В.И., 2008; Poncin S. et al., 2008
- 5) Yamamoto K, Itoh M, Okamura T, Kimura M и др., 2012
- 6) Weetman, A.P., 2004
- 7) Кравец Е.Б., Уразова О.И., Недосекова Ю.В., Рогалева А.В., 2010; K. Mori, K. Yoshida, 2010