

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ДУДИНА МАРГАРИТА АНДРЕЕВНА

**БОЛЕЗНЬ ГРЕЙВСА: ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
КОНСЕРВАТИВНОГО, ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ И
РАДИОЙОДТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ МЕХАНИЗМОВ
НАРУШЕНИЯ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ**

3.1.19. – Эндокринология (медицинские науки)

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Догадин Сергей Анатольевич

Красноярск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	22
1.1. Эпидемиологическая ситуация и медико-социальная проблема рецидивирующего течения болезни Грейвса.....	22
1.2. Органоспецифические и системные иммунопатогенетические механизмы болезни Грейвса.....	27
1.3. Молекулярные и иммуномодулирующие механизмы консервативной терапии тиамазолом.....	43
1.4. Эффективность тиреоидэктомии и радионуклидной терапии в этиотропных подходах к лечению болезни Грейвса.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	62
2.1. Общая характеристика пациентов и дизайн исследования.....	62
2.2. Клинические, лабораторные, инструментальные методы исследования и верификация диагноза.....	67
2.3. Иммунологические методы исследования.....	69
2.3.1. Исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы.....	70
2.3.2. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови.....	71
2.3.3. Определение уровня продукции АФК в нейтрофилах периферической крови методом хемилюминесценции.....	72

2.3.4. Биolumинесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови.....	73
2.4. Статистические методы исследования.....	75
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ, ГОРМОНАЛЬНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ДЕБЮТЕ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА.....	76
3.1. Клинико-гормональная характеристика пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.....	76
3.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.....	82
3.3. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.....	89
3.4. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.....	94
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ТИАМАЗОЛОМ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА.....	100
4.1. Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом.....	100
4.2. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом.....	115

4.3. Уровень продукции АФК и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при компенсированном и некомпенсированном гипертиреозе (рецидив).....	127
ГЛАВА 5. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ОЦЕНКОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ.....	147
5.1. Клиническая характеристика и отбор пациентов с болезнью Грейвса на оперативное лечение.....	149
5.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения.....	154
5.3. Сравнительная характеристика фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии.....	176
5.4. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения.....	189
5.5. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения.....	199
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ РАДИОНУКЛИДНОГО ЛЕЧЕНИЯ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ С ОЦЕНКОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И	

МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА.....	210
6.1. Клиническая характеристика и отбор пациентов с болезнью Грейвса на радионуклидное лечение.....	210
6.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения.....	215
6.3. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения.....	239
6.4. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения.....	258
СПОСОБ ПЕРСониФИЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ВЫБОРУ МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ В ДЕБЮТЕ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА.....	266
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	269
ВЫВОДЫ.....	289
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	293
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	295
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	297

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Болезнь Грейвса (E05.0 Тиреотоксикоз с диффузным зобом) является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием с наследственной предрасположенностью, которое развивается вследствие потери иммунологической толерантности к рецептору тиреотропного гормона (рТТГ) и наиболее частой причиной стойкого гипертиреоза у взрослых, составляющего до 80% от всех новых случаев, а также одну из основных причин обращаемости населения за эндокринологической помощью [1, 7, 20]. Ежегодная заболеваемость составляет примерно 14 случаев на 100 000 человек, болеют преимущественно женщины [53]. Высокая медико-социальная значимость болезни Грейвса обусловлена ее встречаемостью преимущественно у лиц трудоспособного возраста [28, 53, 140].

В последние несколько лет изменился характер течения болезни Грейвса [13, 160, 165]. Отмечается выраженное ускорение манифестации заболевания у людей с отягощенным семейным анамнезом по аутоиммунным заболеваниям щитовидной железы, резкое снижение количества пациентов с ремиссией тиреотоксикоза и ее продолжительностью на фоне консервативной терапии, увеличение частоты встречаемости тяжелых форм патологии [19, 27, 372]. Ликвидация гипертиреоза при консервативной терапии лишь в некоторых случаях приводит к стойкой ремиссии заболевания, а доля пациентов с рецидивом тиреотоксикоза, даже на фоне поддерживающей дозы антитиреоидных препаратов остается высокой и варьирует по данным разных авторов от 37 до 70% [66, 91, 328].

Основной проблемой консервативного лечения болезни Грейвса является длительный протокол терапии антитиреоидными препаратами, чередование гипо- и гипертиреоза на фоне поддерживающей дозы тиреостатика, высокая частота рецидивов в исходе консервативной терапии и объективные трудности их прогнозирования [29, 56, 274].

В свою очередь, эффективность традиционной консервативной терапии болезни Грейвса в настоящее время определяется восстановлением функции щитовидной железы за счет терапии антитиреоидными препаратами, а не индукцией ремиссии аутоиммунного процесса [6, 91, 185]. Несмотря на существующие ограничения в продолжительности приёма антитиреоидных препаратов имеются сообщения о случаях так называемой персистирующей болезни Грейвса, более чем с пятилетним анамнезом непрерывного приёма метимазола и сохраняющимся положительным титром аутоантител к рТТГ [200, 320, 362].

В то же время в клинической практике отсутствуют данные о специфических иммунологических маркерах, определяющих не только целесообразность длительной консервативной терапии тиамазолом, но и имеющих прогностическое значение в развитии истинной иммунологической ремиссии заболевания [281]. Предлагаемые на сегодняшний день методы лечения в большинстве своем направлены лишь на ликвидацию гипертиреоза, а роль иммунологических маркеров в дебюте заболевания и в исходе различных методов лечения недооценивается в клинической практике [89, 238, 347].

Несмотря на высокую эффективность радикальных методов лечения, в 17 – 20% случаев после первого курса введения терапевтической активности радиоактивного йода (^{131}I) у пациентов с болезнью Грейвса развивается рецидив тиреотоксикоза, необходимость повторного курса радионуклидного лечения варьирует от 10% до 48 %, а развившийся пострадиационный гипотиреоз существенно нарушает качество жизни больных [167].

Конкретных рекомендаций по прогнозированию иммунологической ремиссии после консервативного и радионуклидного лечения не существует, точно так же как нет единых алгоритмов персонализированного подхода к прогнозированию эффективности различных методов лечения в дебюте болезни Грейвса, что предопределяет необходимость поиска новых маркеров для разработки этиотропных терапевтических подходов к лечению заболевания [53, 116, 322].

В этой связи исследование широкого спектра клинико-иммунологических показателей с определением функциональной активности и метаболизма клеток иммунной системы у пациентов с болезнью Грейвса в динамике консервативной терапии, а также после оперативного и радионуклидного лечения представляют теоретическую и практическую значимость.

Наиболее актуальной проблемой лечения болезни Грейвса является исследование фундаментальных механизмов регуляции аутоиммунного процесса, не только для выделения биомаркеров прогнозирования эффективности различных методов лечения в дебюте заболевания, но и определения потенциальных мишеней иммуностимулирующей терапии для разработки целенаправленного подхода при персонализированном выборе метода лечения болезни Грейвса.

Степень разработанности проблемы

Многочисленные современные данные свидетельствуют о том, что основной дефект в развитии болезни Грейвса опосредован низким уровнем функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) специфическим антигеном, вследствие аномальности его презентации молекулами, кодируемыми генами HLA, в результате тиреоидспецифические хелперные Т-клетки (Th) 1 и 2 типа активируются [43, 88, 356]. Связь с главным комплексом гистосовместимости, гетерогенность аутоантител, взаимодействующих с рТТГ, циркулирующих в периферической крови даже после радикальных методов лечения заболевания, определяет крайнюю сложность в прогнозировании иммунологической ремиссии болезни Грейвса [184].

По современным представлениям, гипотиреоз, развившийся после тиреоидэктомии или лечения ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса, не влияет на нарушенную регуляторную функцию Treg, дефект которых лежит в основе иммунологической толерантности при гипертиреозе Грейвса [167, 280, 370]. В последнее время, все больше исследователей уделяет внимание Treg, их супрессорной функции в отношении антигенспецифической активности Th-клеток, а также поиску отдельных субпопуляций В-лимфоцитов, дефект которых при болезни Грейвса проявляется и

после радикальных методов лечения заболевания [46, 242, 264]. Считается, что идентификация дефектных субпопуляций Treg и В-клеток поможет создать специфический, целенаправленный подход в лечении болезни Грейвса, представляющий собой новую возможность не только в достижении иммунологической ремиссии заболевания, но и в восстановлении эутиреоза без необходимости пожизненной терапии левотироксином [6, 224, 370]. Однако, дефект регуляторной функции различных субпопуляций Treg при болезни Грейвса требует существенного уточнения и расширения [97].

На современном этапе проблема разработки иммуотропных подходов к терапии болезни Грейвса обуславливает необходимость изучения иммунорегуляторного дефекта Treg после радикальных методов лечения заболевания для выделения отдельных субпопуляций Treg и В-клеток, как возможных мишеней для таргетного воздействия генно-инженерных биологических препаратов [141]. К настоящему времени до конца не выяснены механизмы регуляторных влияний избытка тиреоидных гормонов в гипертиреоидную фазу болезни Грейвса, одни из которых характерны для системной аутоиммунной агрессии, а другие реализуются на местном уровне, в ткани щитовидной железы [83, 291, 315].

Обсуждается роль генерации активных форм кислорода (АФК) и метаболизма клеток иммунной системы, и их тесная связь с усугублением дефекта антигеноспецифической иммуносупрессии и развитием иммунной атаки, как в дебюте болезни Грейвса, так и при рецидиве заболевания [92, 201, 270].

В то же время, в литературе отсутствуют данные о конкретных иммунореактивных молекулах, как вовлеченных в развитие аутоиммунной реакции в разные периоды клинического течения заболевания, так и имеющие прогностическое значение в плане риска развития рецидива гипертиреоза после лечения антитиреоидными препаратами. Это обуславливает необходимость проведения иммунологических исследований в разные стадии развития, а также в исходе различных методов лечения заболевания [264, 271, 279]. В связи с этим, представляется важным изучить особенности иммунорегуляторного дефекта Treg и функционально-метаболические показатели клеток иммунной системы у пациентов с болезнью

Грейвса при индукции тиреотоксикоза, как в дебюте, так и при рецидиве заболевания.

Наиболее актуальной проблемой при болезни Грейвса является изучение уровня экспрессии активационных маркеров лимфоцитов в ткани щитовидной железы и состояния важнейших биохимических процессов в клетках иммунной системы, как при достижении медикаментозного эутиреоза для выяснения иммуномодулирующих влияний антитиреоидной терапии так и в исходе радионуклидного, и оперативного лечения для раскрытия потенциальных мишеней иммуотропной терапии и разработки этиотропных терапевтических подходов к лечению заболевания.

Цель исследования

Персонифицировать подходы к выбору лечения у пациентов с болезнью Грейвса на основе оценки механизмов дисрегуляции иммунной системы.

Задачи исследования

1. Установить особенности клинико-гормональных и иммунологических показателей у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.

2. Изучить у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови и их взаимосвязь с показателями тиреоидного статуса.

3. Определить клинико-иммунологические маркеры и механизмы прогрессирования аутоиммунного процесса при рецидиве болезни Грейвса.

4. Установить закономерности и соотношение фенотипического состава лимфоцитов в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса для уточнения возможных иммуномодулирующих эффектов тиамазола.

5. Исследовать возможную роль АФК у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза в механизмах потери аутоотолерантности к антигенам щитовидной железы.

6. Провести сравнительный анализ фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения.

7. Изучить фенотипический состав лимфоцитов и функционально-метаболические показатели нейтрофилов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса после оперативного и радионуклидного лечения для раскрытия механизмов иммунологической ремиссии заболевания.

8. Установить закономерности дисрегуляции иммунной системы и потенциальные мишени иммулотропной терапии у пациентов с болезнью Грейвса после консервативного, оперативного лечения и РЙТ.

9. На основании комплексного клинико-иммунологического анализа разработать способ персонафицированного подхода к выбору метода лечения болезни Грейвса.

Объект и предмет исследования

Объект исследования – 180 пациентов с болезнью Грейвса. Предмет исследования – проведение клинико-гормональных и иммунологических исследований для разработки методов персонафицированного подхода к выбору лечения и раскрытия потенциальных мишеней иммулотропной терапии болезни Грейвса.

Научная новизна результатов исследования

Впервые на большом клиническом материале проведено комплексное сравнительное клинико-иммунологическое исследование фенотипического состава, функциональной активности и внутриклеточного метаболизма клеток иммунной системы. Выявленные существенные изменения в фенотипическом составе лимфоцитов, генерации АФК и внутриклеточной активности ферментов нейтрофилов

свидетельствуют о выраженной дисрегуляции всей системы иммунитета, не зависят от компенсации гипертиреоза и титра антител к рТТГ.

Установлены иммунологические механизмы поддержания аутоиммунного процесса, основные клинико-иммунологические маркеры рецидивирующего течения заболевания и прогнозирования исходов различных методов лечения.

Доказаны иммуномодулирующие эффекты длительной консервативной терапии тиамазолом на систему адаптивного иммунитета, впервые выявлены дефектные субпопуляции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) и В-клеток ($CD19^+$) у пациентов с болезнью Грейвса после консервативного, оперативного и радионуклидного лечения. Повышение количества активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) в периферической крови сохраняется у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза более года, что может быть связано с выраженностью регуляторного дефекта Treg и открывает новые перспективы в разработке иммуотропной терапии заболевания.

Впервые показано разобщение анаэробных и аэробных энергетических процессов в нейтрофилах при повышении активности дегидрогеназных реакций, определяющих состояние пластических и анаболических процессов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса до начала консервативной терапии тиамазолом.

Выявлены нарушения механизмов, ответственных за реализацию кислородного метаболизма нейтрофилов крови в гипертиреоидную фазу болезни Грейвса, что может влиять на развитие полноценного цитопатогенного эффекта нейтрофилов при инициации аутоиммунного процесса в дебюте заболевания.

Впервые установлены изменения в генерации АФК в нейтрофилах крови с существенным увеличением суммарной продукции первичных и вторичных кислородных радикалов при длительном медикаментозном эутиреозе у пациентов с болезнью Грейвса, что демонстрирует ведущую роль данных молекул в иммунопатогенезе рецидива и убедительно доказывает концепцию о наличии самостоятельного вектора иммунных нарушений – системной интенсификации образования АФК независимо от функционального состояния органа-мишени.

На основе комплексных иммунологических методов исследования представлены новые доказательства в координации дефекта иммунорегуляции Treg периферической крови и ткани щитовидной железы. Впервые дана сравнительная характеристика фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и органа-мишени, и доказано снижение содержания и функции Treg. Выявленные иммунологические механизмы свидетельствуют о наличии двух одновременно протекающих процессов: снижения количества и регуляторной функции Treg и миграции активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в ткань щитовидной железы. Недостаточная активация Treg при эутиреоидном состоянии у пациентов с болезнью Грейвса существенно дополняет иммунопатогенетические аспекты первичного дефекта в системе иммунитета и раскрывает перспективы для разработки таргетной терапии заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования показателей метаболизма и экспрессии активационных маркеров клеток иммунной системы, сопряженные с тиреоидной функцией и аутоиммунным процессом в органе-мишени, раскрывают иммунотиреоидные механизмы рецидива и дополняют представления о дисрегуляции аутоиммунитета при болезни Грейвса. Выявленные закономерности в изменении фенотипического состава Т-лимфоцитов периферической крови на фоне консервативного лечения свидетельствуют об иммуномодулирующих эффектах длительной терапии тиамазолом на систему адаптивного иммунитета при болезни Грейвса. Полученные результаты позволяют выделить субпопуляцию Treg не только в качестве возможного маркера иммунологической ремиссии заболевания перед завершением курса длительной консервативной терапии тиамазолом, но и как мишень для таргетной терапии регуляторного дефекта иммунной системы.

Впервые установленные закономерности синтеза АФК у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза существенно

дополняют иммунопатогенетическую концепцию адаптации нейтрофилов к системным изменениям тиреоидного статуса при консервативном лечении заболевания. Высокий системный уровень синтеза первичных и вторичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса, на фоне поддерживающей дозы тиамазола, может являться не только дополнительным индикатором прогрессирования аутоиммунного процесса и рецидива гипертиреоза, но и раскрывает ограничения иммуномодулирующих эффектов антитиреоидных препаратов, определяя вектор патогенетического лечения заболевания.

По результатам проведенного исследования решена научная задача в определении потенциальных мишеней иммулотропной терапии и выделены три дефектные субпопуляции лимфоцитов крови, низкий уровень которых установлен, как исходно, так и через 6 месяцев после оперативного, и радионуклидного лечения: наивные Treg ($CD45R0^-CD62L^+$), терминально-дифференцированные Treg ($CD45R0^-CD62L^-$) и В-клетки памяти ($CD19^+CD27^+$), определение которых существенно дополняет модель дефекта регуляторной функции иммунной системы при болезни Грейвса.

Разработан способ раннего прогнозирования рецидива при консервативном лечении тиамазолом у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, основанный на определении процентного числа активированных В1-лимфоцитов ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и Т-лимфоцитов ($CD3^+$) крови с последующим расчетом коэффициента В1-клеточной активации (В1КА): $В1КА = \text{активированные В1-лимфоциты} / \text{Т-лимфоциты}$, который позволяет определить целесообразность длительного консервативного лечения заболевания (патент РФ № 2778614 от 22.08.2022).

Разработан способ прогнозирования эффективности радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса, основанный на определении процентного числа активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и В-лимфоцитов ($CD19^+$) крови с последующим расчетом коэффициента Т-хелперной регуляции (ТХР): $ТХР = \text{активированные Т-хелперы} / \text{В-лимфоциты}$, что позволяет оптимизировать протокол

и исключает необходимость повторного курса РИТ (патент РФ № 2791390 от 07.03.2023).

В диссертационном исследовании решена научно-практическая проблема лечебной тактики и прогнозирования исходов различных методов лечения в дебюте болезни Грейвса. На основании проспективных исследований разработан способ персонализированного подхода к выбору метода лечения при впервые выявленной болезни Грейвса, основанный на расчете коэффициента В-клеточной регуляции (ВКР):
$$\text{ВКР} = \frac{\text{активированные В-лимфоциты (CD19}^+\text{CD23}^+ \text{) / Treg (CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{Low}}\text{CD25}^{\text{High}} \text{)}}{\text{}}$$
, использование которого позволяет реализовать персонализированный алгоритм в выборе метода лечения в дебюте заболевания (патент РФ № 2794815 от 25.04.2023).

Методология и методы диссертационного исследования

Методология исследования планировалась в соответствии с современными принципами научного познания и поставленной целью. Работа базировалась на принципах доказательной медицины. Проведено проспективное, одноцентровое, продольное, когортное, сплошное, открытое, неинтервенционное, сравнительное клиническое исследование с использованием клинических, иммунологических, гормональных, биохимических и статистических методов с участием пациентов с лабораторно подтвержденной болезнью Грейвса. Все исследования выполнены на сертифицированном оборудовании.

Проведен анализ результатов клинко-иммунологического обследования с целью сравнения с существующими клиническими рекомендациями по диагностике и лечению болезни Грейвса.

При выполнении работы использовали отечественные и международные научные базы данных «PubMed», «MeSH Database», «elibrary», материалы российских (Всероссийский эндокринологический конгресс) и международных научных конференций (Annual meeting of the American Thyroid Association, European Congress of Endocrinology).

Анализ полученных результатов проводили с использованием общепринятых статистических методов анализа биомедицинских данных с использованием непараметрических методов и программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007), что обеспечило достоверность сформулированных положений, выводов и рекомендаций. Полученные в ходе статистического анализа данные легли в основу разработанного способа персонафицированного подхода к выбору метода лечения в дебюте болезни Грейвса.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса антитела к рТТГ являются тиреоидспецифическим маркером заболевания, но не определяют иммунную реактивность в дебюте гипертиреоза. Активация аутоиммунного процесса в дебюте болезни Грейвса реализуется при уровне антител к ТПО > 100 мЕд/л и увеличении содержания В-лимфоцитов. Выявленное смещение в направлении регуляторного влияния повышенного уровня тиреоидных гормонов на продукцию кислородных радикалов нейтрофилами у пациентов с рецидивом болезни Грейвса не только на начальном этапе окислительных реакций, но и на уровне продукции вторичных АФК свидетельствует об активации иммунологических механизмов системного клеточного реагирования и является одним из механизмов реактивации аутоиммунного процесса при рецидиве заболевания.

2. Снижение количества Treg в периферической крови при болезни Грейвса, а также отсутствие сонаправленной иммунорегуляторной реакции интратиреоидных активированных В-лимфоцитов (общие В-клетки, В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти) на изменение содержания Treg с одной стороны и Th-клеток с другой стороны, свидетельствует о тяжелом регуляторном дефекте Treg, который определяет стойкое повышение активированных В-лимфоцитов и Th-клеток.

3. Длительный медикаментозный эутиреоз, индуцированный тиамазолом, оказывает иммуномодулирующий эффект на систему адаптивного иммунитета при болезни Грейвса – способствует повышению уровня Treg в периферической крови,

но не влияет на их регуляторную функцию, генерацию АФК и метаболические показатели клеток иммунной системы, что определяет персистенцию аутоиммунного процесса и рецидив заболевания.

4. На основе определения коэффициента В-клеточной регуляции разработан метод, позволяющий оптимизировать алгоритм и реализовать персонализированный подход к выбору лечения в дебюте заболевания.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.1.19. - Эндокринология (медицинские науки), охватывающей проблемы изучения этиологии и патогенеза, разработки и применения методов диагностики, лечения и профилактики заболеваний эндокринной системы.

Область диссертационного исследования включает разработку персонализированного подхода к выбору метода лечения болезни Грейвса в дебюте заболевания с целью оптимизации протоколов лечения и повышения эффективности специализированной медицинской помощи при болезни Грейвса, а также расширения концепции иммунопатогенеза и определения мишеней этиотропной терапии заболевания, и соответствует п. 2. «основные принципы функционирования эндокринной системы и действия гормонов в норме и при различных патологических состояниях», п. 4. «этиология и патогенез эндокринных заболеваний, методы диагностики заболеваний эндокринной системы с использованием клинических, лабораторных, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика различных форм нарушения гормональной регуляции» и п. 5. «лечение эндокринных заболеваний: гормонотерапия, химиотерапия, хирургическая коррекция, лучевая терапия, патогенетическая терапия, разработка новых методов лечения эндокринных заболеваний (генотерапия, поиск локаторов и стимуляторов секреции гормонов и др.)» паспорта специальности 3.1.19. - Эндокринология.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности подтверждена количеством участников исследования (180 пациентов с болезнью Грейвса и 85 практически здоровых человек контрольной группы), сопоставимых по полу и возрасту; использованием современных клинико-гормональных и иммунологических методов исследования с применением сертифицированного оборудования и реактивов, при постоянном использовании контрольных тестов. Анализ полученных результатов проводился с помощью современных статистических методов обработки медицинских данных на репрезентативном количестве наблюдений и с использованием сертифицированной программы.

Исследование проведено с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства РФ от 19.06.2003, № 266. Проведение диссертационного исследования одобрено независимым комитетом по этике КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (протокол № 124 от 7 апреля 2016 г.) и ФГБОУ ВО КрасГМУ (протокол № 72 от 9 ноября 2016 г.). Апробация работы состоялась на заседании Проблемной комиссии по внутренним болезням и кардиологии (протокол заседания № 1 от 28 января 2023 года).

Результаты исследования доложены и обсуждены на всероссийских и международных конгрессах, и научных конференциях: 18th European congress of Endocrinology, Мюнхен (2016); VII Всероссийском конгрессе эндокринологов «Достижения персонализированной медицины сегодня - результат практического здравоохранения завтра», Москва (2016); Региональной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири», Красноярск (2016); Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии», Москва (2017); 19th European congress of Endocrinology, Лиссабон (2017), EYES meeting,

Порто (2017); 11th International Congress on Autoimmunity, Лиссабон (2018); 20th European Congress of Endocrinology, Барселона (2018); EYES meeting, Познань (2018); VIII Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение», Москва (2019); 21st European Congress of Endocrinology, Лион (2019), 22nd European Congress of Endocrinology, Прага (2020); IV Национальном конгрессе эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии», Москва (2021); 90th Thyroid Association virtual Annual Meeting (2021); 24th European Congress of Endocrinology, Милан (2022), 25th European Congress of Endocrinology, Стамбул (2023); X (XXIX) Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение», Москва (2023).

Результаты исследования доложены на заседании проблемной комиссии по внутренним болезням и кардиологии и кафедры госпитальной терапии и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс по программам ординатуры, аспирантуры, циклов института последипломного образования по специальности «Эндокринология» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, где включены в курс лекций и практических занятий (акты внедрения от 3 марта 2022 г. и от 6 мая 2022 г.), а также КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск (акт внедрения от 18 мая 2022 г.).

Личный вклад автора в получение научных результатов

Автором лично проводилось наблюдение и лечение всех пациентов с болезнью Грейвса, получены все первичные данные, лично и под руководством научных

сотрудников лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии получены все представленные в диссертационной работе научные результаты. Постановка проблемы, научная гипотеза работы, формулировка целей и задач, отработка методологии, статистическая обработка и оценка полученных результатов исследования, формулировка положений, выносимых на защиту, выводы и практические рекомендации, написание диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно.

Публикации

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в 53 публикациях, из них 13 статей в научных журналах и изданиях, включенных ВАК РФ в перечень Российских рецензируемых научных журналов и изданий для изложения основных научных результатов диссертационных исследований, 9 публикаций в журналах, включенных в международную базу цитирования Scopus и 17 в зарубежной печати. Получен патент РФ «Способ прогнозирования развития рецидива при медикаментозном лечении болезни Грейвса» (№ 2778614, приоритет изобретения 01 декабря 2021 г., зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 22 августа 2022 г.). Получены патенты РФ «Способ прогнозирования радиойодтерапии болезни Грейвса» (№ 2791390, приоритет изобретения 15 апреля 2022 г., зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 07 марта 2023 г.) и «Способ персонифицированного подхода к выбору метода лечения болезни Грейвса» (№ 2794815, приоритет изобретения 26 августа 2022 г., зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 25 апреля 2023 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 338 страницах машинописного текста, иллюстрирована 22 рисунками и 43 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», четырех глав собственных исследований и

обсуждения их результатов, главы по разработанному способу персонифицированного подхода к выбору метода лечения в дебюте болезни Грейвса, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 33 российских и 340 зарубежных источников.

Благодарности

Глубокая признательность за помощь и плодотворное сотрудничество в выполнении клинического этапа работы и иммунологических исследований руководителю лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера – обособленного подразделения ФГБНУ «ФИЦ «КНЦ СО РАН» д.м.н., профессору А.А. Савченко, научным сотрудникам И.И. Гвоздеву и к.б.н. В.Д. Беленюку, хирургу-эндокринологу высшей категории В.А. Маньковскому, директору ФГБУ «ФСНКЦ» ФМБА России, г. Красноярск Н.Г. Чанчиковой,

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Эпидемиологическая ситуация и медико-социальная проблема рецидивирующего течения болезни Грейвса

Болезнь Грейвса имеет ежегодную заболеваемость от 20 до 50 случаев на 100 000 человек, женщины более восприимчивы, чем мужчины [140]. Пик заболеваемости приходится на пациентов в возрасте 30-60 лет, причем повышенная заболеваемость наблюдается среди афроамериканцев [353]. Болезнь Грейвса является наиболее распространенной причиной тиреотоксикоза в географических районах с нормальным содержанием йода, где ежегодно регистрируется 20-30 случаев на 100 000 человек [371]. Однако, некоторые эпидемиологические исследования показали, что частота рецидивов у пациентов с болезнью Грейвса после завершения курса лечения антитиреоидными препаратами в регионах с нормальным содержанием йода не выше, чем в йододефицитных районах [5, 28, 243].

В 2001 году распространённость тиреотоксикоза в России составила 18,4 случаев на 100 000 населения [27]. По данным российского ретроспективного анализа, частота рецидивов гипертиреоза при болезни Грейвса составляет 63-80%, а стойкий медикаментозный эутиреоз достигают не более 30% больных [7]. Более того, при повторных попытках назначения антитиреоидных препаратов, процент пациентов с длительным медикаментозным эутиреозом прогрессивно снижается [66, 131, 328]. По данным Американской тиреоидной ассоциации в 2011 году распространённость тиреотоксикоза составила 1,2 – 1,6%, манифестного тиреотоксикоза - 0,5–0,6% и субклинического - 0,7 – 1,0% [166].

Многие авторы подчеркивают, что истинную распространённость болезни Грейвса оценить достаточно сложно, так как полноценных эпидемиологических данных недостаточно, а большинство исследований сосредоточены на распростра-

ненности синдрома гипертиреоза в целом, а не конкретно на болезни Грейвса [164, 165, 172].

Как свидетельствует опыт эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» болезнь Грейвса (E05.0.Тиреотоксикоз с диффузным зобом, ДТЗ) составляет одну из основных причин обращаемости населения за эндокринологической помощью. Болезнь Грейвса составляет до 80% всех случаев впервые выявленного гипертиреоза и наиболее часто встречается у женщин в возрасте от 21 до 43 лет [9]. В 2015 году в Красноярском крае зарегистрировано 3 188 вновь выявленных случаев болезни Грейвса при населении 2 858 773 человек. Согласно данным статистической отчетности на 1 января 2009 года численность населения центральных районов Красноярского края (Красноярск, Дивногорск, Железногорск, Сосновоборск) в возрасте 20 лет и старше составляла 1025 125 человек. По данным годовых отчетов врачей-эндокринологов на 1 января 2009 года было зарегистрировано 1139 больных болезнью Грейвса, в том числе 190 человек (17,00 %) с впервые выявленным заболеванием. В целом, распространенность болезни Грейвса среди взрослого населения центральных районов Красноярского края в 2009 году составила 1,11 (доверительный интервал: 0,04-1,17), заболеваемость - 0,18 (д.и.: 0,15-0,20) на 1000 человек в возрасте 20 лет и старше. Распространенность болезни Грейвса среди населения центральных районов Красноярского края в 2018 году составила 0,94 (д.и.: 0,88-0,99) на 1000 человек и оказалась ниже, чем в 2009 году ($\chi^2=14,74$, $p<0,0001$).

Сравнительный анализ десятилетней заболеваемости ДТЗ в Северных районах Красноярского края (Норильск, Енисейск, Лесосибирск) также выявил отличия. Среди жителей севера Красноярского края частота новых случаев болезни Грейвса за последние 10 лет уменьшилась почти в 2 раза ($\chi^2=11,05$, $p<0,001$).

Распределение по показателям распространенности ДТЗ среди территориальных округов Красноярского края продемонстрировало, что наименьшее число пациентов с болезнью Грейвса отмечается среди жителей Южных районов края (Минусинск, Ермаковск, Краснотуранск).

Распространенность болезни Грейвса в этих районах края в 2009 и 2018 гг. составила, соответственно, 1,17 и 0,96 на 1000 жителей. При этом, показатель распространенности заболевания достоверно не изменялся на протяжении десяти лет. Анализ заболеваемости болезнью Грейвса в основных климато-географических регионах Красноярского края позволил установить, что показатель первичной заболеваемости выше в Северной группе районов, как в сравнении с Центральной ($\chi^2=311,15$, $p<0,0001$), так и Южной ($\chi^2=16,41$, $p<0,0001$) группой районов.

В динамике с 2009 по 2018 гг. в Центральных районах края отмечалось умеренное снижение роста распространенности болезни Грейвса среди взрослого населения, а наименьшее число пациентов и низкий показатель распространенности заболевания отмечался, напротив, среди жителей Южных районов края (Минусинск, Ермаковск, Краснотуранск). В Северных районах края с 2009 по 2018 гг. отмечалась тенденция к снижению заболеваемости болезнью Грейвса, при этом показатель первичной заболеваемости в 2018 г. был выше в Северной группе районов, как в сравнении с Центральной, так и Южной группой районов Красноярского края.

Ретроспективный анализ динамики показателей распространенности и заболеваемости болезнью Грейвса среди пациентов, проживающих в Красноярском крае, за период с 2009 по 2018 гг. позволил установить, что несмотря на относительно стабильные основные эпидемиологические показатели заболевания, доля пациентов с рецидивирующим гипертиреозом и отсутствием ремиссии на фоне длительной консервативной терапии тиамазолом за последние 10 лет существенно возросла [9]. Кроме того, значительно сократилось число пациентов, достигших стойкого медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом. Ранее средняя продолжительность медикаментозного эутиреоза составляла от года до нескольких десятков лет, однако в настоящее время отмечается тенденция к сокращению данного промежутка времени до нескольких месяцев. Похожие сложности в курации синдрома гипертиреоза при болезни Грейвса и достижении стойкой ремиссии заболевания описывают и другие авторы [13, 112, 128].

Рецидив заболевания при приеме поддерживающей дозы тиреостатика, составляет 50 - 60%, а после отмены анти тиреоидных препаратов может достигать

70% случаев, причем чаще рецидив гипертиреоза диагностируют в первые 12 месяцев после отмены консервативной терапии [55, 264, 267]. Кроме того, в последнее время отмечается перманентная активность аутоиммунного процесса, которая клинически проявляется сменой фаз гипертиреоза, медикаментозного гипо-и эутиреоза [258, 319, 364].

Имеются сообщения о частичной резистентности к действию антитиреоидных препаратов, которая проявляется постоянно низким уровнем ТТГ, даже при оптимальном алгоритме и продолжительности консервативной терапии тиамазолом [56, 57, 85].

В основе гипертиреоза аутоиммунного генеза при болезни Грейвса лежит образование иммуноглобулинов класса G, которые связываются и стимулируют рТТГ и являются единственным маркером прогнозирования рецидива заболевания в клинической практике [2, 29, 158]. Однако, современные данные указывают на ограниченность данного маркера в связи с широким спектром биологической активности антител к рТТГ [337, 340, 347]. Некоторые авторы подчеркивают, что в прогнозировании рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса существенное значение играет биологическая активность антител к рТТГ, а не их количественная оценка [76, 144, 194]. Причем, у части пациентов с болезнью Грейвса наблюдается устойчивость к десенсибилизации за счет снижения ТТГ и отрицательных циркулирующих антител к рТТГ, что позволяет сохранить гипертиреоидное состояние [296]. В этой связи, другие авторы подчеркивают, что рТТГ не регулируется процессом транскрипции и низкий уровень стимуляции щитовидной железы стимулирующими антителами к рТТГ (TSAб) в этом случае свидетельствует о прямой регуляции рТТГ с помощью ТТГ, возможно, на основе стабилизации мРНК, и, соответственно их прогрессивной сменой биологической активности [348]. В зависимости от преобладания той или иной фракции антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса наблюдаются колебания от гипер- к гипотиреозу, что значительно затрудняет терапию пациента и удержание стойкого медикаментозного эутиреоза [2, 284, 319].

В связи с этим, проблема определения антител к рТТГ в клинической практике заключается не только в экономических аспектах широкого определения от-

дельных фракций этих антител, но и в диагностической точности каждой из этих фракций в прогнозировании рецидива заболевания [16, 29, 368].

Известно, что ключевой особенностью рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса является значительное повышение уровня свТ3 в сыворотке крови, которое связано с высокой активностью интратиреоидной дейодиназы 1 типа [214]. Последующие исследования показали, что уровень свТ3 и коэффициент свТ3/свТ4 в дебюте болезни Грейвса были независимыми предикторами исходов лечения антитиреоидными препаратами [294]. Пациенты с болезнью Грейвса с более высокими уровнями Т3 в сыворотке крови и коэффициентом свТ3/свТ4 имеют относительно более высокий риск рецидивирования, поэтому им часто требуется более высокая начальная доза и более продолжительное лечение антитиреоидными препаратами [144]. Кроме того, высокое соотношение свТ3/свТ4 после завершения курса консервативной терапии прогнозирует высокий риск рецидива заболевания [122]. Имеются сообщения о том, что у многих пациентов с болезнью Грейвса при длительной консервативной терапии антитиреоидными препаратами и нормализации уровня свТ4, и ТТГ, сохраняется неполное ингибирование синтеза тиреоидных гормонов с повышенной концентрацией свТ3, что может приводить к рецидиву гипертиреоза [65, 108, 343]. Однако, иммунологические механизмы поддержания изолированного высокого свТ3 остаются до сих пор неизученными [263].

Приводятся данные о том, что риск рецидива при консервативной терапии выше у лиц молодого возраста с большими размерами щитовидной железы, исходно высоким уровнем тиреоидных гормонов, при ассоциации с аллелями главного комплекса гистосовместимости (HLA) - HLA-DR3 и DRW3, а также высоким уровнем антител к рТТГ на фоне лечения антитиреоидными препаратами [113, 320, 328].

Помимо перечисленных выше, многие авторы к предикторам рецидива относят: низконормальный уровень ТТГ в сыворотке крови на фоне консервативного лечения, «плоскую» кривую реакции ТТГ на введение тиреотропин-рилизинг гормона, высокое поглощение радиоактивного йода при одновременном применении с

левотироксином, гипоэхогенность тиреоидной ткани при УЗИ, а также наличие HLA-D3 аллеля DQA24 [34, 160, 163].

Однако, большинство исследователей сходятся во мнении, что ни один из перечисленных маркеров сам по себе не является настолько точным, чтобы его можно было с высокой специфичностью использовать в клинической практике [91, 114, 163].

Таким образом, как показывает мировой клинический опыт, трудности в поддержании медикаментозного эутиреоза при консервативном лечении болезни Грейвса все еще велики, а рецидивирующее течение гипертиреоза является отражением сложных иммунологических аспектов персистенции заболевания, механизмы которых требуют существенного уточнения и расширения [254, 307, 320].

В связи с этим, необходимы дополнительные широкомасштабные контролируемые исследования не только с целью выделения прогностических маркеров эффективности длительной консервативной терапии антитиреоидными препаратами, а прежде всего для раскрытия иммунологических механизмов рецидивирующего течения аутоиммунного процесса при болезни Грейвса, как основных мишеней современного иммуотропного лечения заболевания.

1.2. Органоспецифические и системные иммунопатогенетические механизмы болезни Грейвса

Болезнь Грейвса – органоспецифическое аутоиммунное заболевание, которое имеет мультифакториальную этиологию, включая связь HLA II класса с нарушением толерантности к антигенам щитовидной железы, которая реализуется под воздействием определенных эпигенетических факторов в виде патологического иммунного ответа с развитием лимфатической инфильтрации тиреоидной паренхимы и продукции аутоантител к различным компонентам тиреоцитов [99, 260, 322].

Основная роль в инициации и прогрессировании аутоиммунного процесса при болезни Грейвса принадлежит специфическим иммуноглобулинам (Ig) класса

G – антителам к рТТГ, которые секретируются аутореактивными В-лимфоцитами [256].

Зрелый рТТГ представляет собой рецептор, связанный с G-белком, обнаруженный главным образом в фолликулярных клетках щитовидной железы [113, 118, 144]. Повышенный уровень циркулирующих гормонов щитовидной железы при гипертиреозе Грейвса развивается из-за TSAb, которые связываются с богатыми лейцином повторами во внеклеточном домене рТТГ, расположенном на поверхности тиреоцитов [40, 42, 278]. Это имитирует действие ТТГ, приводящее к чрезмерной автономной выработке тиреоидных гормонов и гиперплазии эпителиальных клеток щитовидной железы.

Основной дефект в иммунной системе при болезни Грейвса заключается в меньшей активации Treg специфическим антигеном, вследствие аномальности его презентации молекулами, кодируемыми HLAII класса [39, 125, 181]. Провоцирующие внешние факторы снижают активность неспецифических Treg, усугубляя тем самым дисфункцию антигенспецифических Treg [301].

Супрессия тиреоидспецифических Th-клеток, -Th1- и Th2-клеток, ослабляется в такой степени, что они в присутствии антигена и антигенпрезентирующих клеток выходят из под контроля, и активируются [77]. Активированные Th-клетки прямо влияют на тиреоциты, продуцируя цитокины, необходимые на любой стадии процесса, кооперируются с цитотоксическими клетками, что приводит к повреждению тиреоидной ткани [356]. Активированные Th1-клетки выделяют интерферон-гамма (IFN- γ) в непосредственное окружение тиреоцитов, индуцируя экспрессию ими HLAII класса, которые либо превращают тиреоциты в антигенпрезентирующие клетки, либо играют защитную роль [257]. Th-клетки, также, способствуют продукции В-лимфоцитами TSAb, действующих, подобно ТТГ, и вызывающих гиперфункцию, и пролиферацию тиреоцитов [197, 206, 315].

Роль В-клеток при гипертиреозе Грейвса хорошо изучена не только в их качестве секретирующих иммуноглобулин плазматических клеток, продуцирующих аутоантитела к рТТГ, но и в их способности действовать как антигенпрезентирующие клетки, вероятно, представляя эпитопы рТТГ Т-клеткам для поддержания ау-

тоиммунного процесса, а также модуляции иммунного ответа путем продуцирования как про-, так и противовоспалительных цитокинов и хемокинов [76, 285, 306].

Болезнь Грейвса сопровождается продукцией органоспецифических аутоантител, инфильтрацией железы различными субпопуляциями лимфоцитов и продукцией ими широкого спектра цитокинов, в частности, фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкина-2 (IL-2), и IL-4 [4, 51, 223].

Гистологически щитовидная железа при гипертиреозе Грейвса представляет собой диффузную гиперплазию фолликулярных клеток с различной степенью лимфоцитарной инфильтрации в строме железы [203]. Эти инфильтраты состоят как из Т-, так и из В-лимфоцитов и могут образовывать эктопические внутрищитовидные зародышевые центры, создавая важный источник патогенных плазматических клеток, продуцирующих антитела к рТТГ [332]. Лимфоидная и плазмоцитарная инфильтрация стромы щитовидной железы, будучи признаками иммуноморфологических реакций, соответствует часто наблюдаемой циркуляции антитиреоидных антител в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса [50]. Причем, у большинства пациентов с болезнью Грейвса Т- и В-лимфоциты направлены против трех, хорошо изученных аутоантигенов щитовидной железы - рТТГ, тиреоидной пероксидазы (ТПО) и тиреоглобулина (ТГ), так же, как и против менее изученного – натрий-йодного симпортера (NIS) [74, 305, 363].

В аутоиммунный процесс при болезни Грейвса могут вовлекаться все компоненты паренхимы щитовидной железы [100, 366, 369].

Существует предположение, что тиреоциты, экспрессируя молекулы HLA и презентирова антиген непосредственно Т-клеткам, могут инициировать аутоиммунный процесс, после воздействия какого-либо внешнего стимула [275, 356, 370]. В литературе представлены противоречивые данные относительно изменения самих тиреоцитов или тиреоидных аутоантигенов [148, 315, 340]. Впервые «абберантная» экспрессия антигенов HLA II класса (HLA-DR) на поверхности тиреоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы была описана достаточно давно [42]. Многочисленные современные данные свидетельствуют о том, что экспрессия HLA-DR тиреоцитами является не пусковым моментом аутоиммунных тиреопатий,

а вторичным процессом [6, 146, 177]. Молекулы HLA-DR появляются на поверхности тиреоцитов в ответ на действие IFN- γ , которые выделяют активированные интратиреоидные Th-клетки, сенсibilизированные к тиреоидному антигену [110, 322, 359]. Другие авторы показали, что экспрессия HLA-DR тиреоцитами в культуре требует присутствия не только Th-клеток, но и моноцитов [331]. При удалении тех или других тиреоцитов не экспрессируют HLA-DR.

Более того, реакция тиреоидной ткани пациентов с болезнью Грейвса на IFN- γ и TNF- α такая же, как нормальная паренхима щитовидной железы, поскольку уровень экспрессии HLA-DR и молекул клеточной адгезии (ICAM-1) на добавление этих цитокинов в культуру тиреоцитов не изменяется [145]. Имеющиеся к настоящему времени данные демонстрируют, что клетки щитовидной железы пациентов с ремиссией болезни Грейвса, индуцируемой антитиреоидными препаратами, а также ксенотрансплантаты тиреоидной ткани пациентов с болезнью Грейвса у голых мышей нормально функционируют, нормально реагируют на физиологические регуляторы, а ксенотрансплантаты нормально подавляются экзогенными тиреоидными гормонами [132]. Таким образом, в литературе нет убедительных данных об иммунологически значимых изменениях тиреоидных антигенов при болезни Грейвса.

К настоящему времени известно, что растворимая форма рТТГ присутствует в крови и в норме [361, 338, 349]. Также, нет данных о сколько-нибудь существенных изменениях антигенов, которые могли бы приводить к развитию аутоиммунного процесса при болезни Грейвса. Очевидно, что презентация антигена требует экспрессии антигенов HLA I и II классов на антигенпрезентирующих клетках [160]. Большинство имеющихся данных подтверждают, что тиреоидная клетка при болезни Грейвса исходно нормальна и экспрессирует HLA-DR, ICAM-1 и белок теплового шока (hsp) лишь вследствие иммунологических нарушений, в свою очередь экспрессия этих молекул усиливает аутоиммунный процесс [118, 145, 190].

Более того, по современным представлениям первичный иммунный ответ при манифестации гипертиреоза Грейвса имеет олигоклональную природу, а изменение функциональной активности Т- и В-лимфоцитов является вторичной поликлональной иммунной реакцией [46, 60, 100].

Тем не менее, наиболее патогенетически значимым и изученным антигеном щитовидной железы при болезни Грейвса является рТТГ, относящийся к членам семейства G-белок-сопряженных рецепторов [79, 96, 113].

Внетиреоидная продукция антител к рТТГ была обнаружена в региональных участках костного мозга и лимфатических узлах, что объясняет, почему антитела к рТТГ, хотя и в сниженных концентрациях, циркулируют после хирургического лечения болезни Грейвса [73]. К настоящему времени известно, как минимум три вида антител к рТТГ, TSAb, блокирующие и предотвращающие активацию рецептора ТТГ (TBAb) и нейтральные [97, 123, 305]. Существующие данные свидетельствуют о том, что TSAb или TBAb имеют разные антигены, при этом субъединица А, образующаяся в результате расщепления рТТГ на поверхности тиреоцитов, а не голорецептор ТТГ, более важна для индукции и созревания сродства TSAb, которые вызывают гипертиреоз Грейвса [68, 144, 348].

Напротив, голорецептор ТТГ является гораздо более мощным иммуногеном для TBAb [176, 194, 196]. TSAb должны усиливать индуцируемую IFN- γ экспрессию HLA-DR и презентацию тиреоидных антигенов, способствуя дальнейшей активации Th-клеток [101, 146, 284]. По некоторым данным TSAb связываются на ограниченном участке конформационного эпитопа внеклеточного домена рТТГ, а TBAb захватывают более одного эпитопа [208, 256, 337].

В то же время, следует обратить внимание на то, что присутствие в крови антител к рТТГ отмечено, как у пациентов с болезнью Грейвса, так и при хроническом аутоиммунном тиреоидите (АИТ). Сообщается об образовании TSAb у 2–5% больных с тиреотоксической фазой АИТ и синдромом гипертиреоза не аутоиммунного генеза [343]. Обосновано также и то, что в крови у больных АИТ часто выявляется комбинация TSAb и TBAb, но клиническое обоснование и применение данный феномен в настоящее время не получил [60, 103, 240].

Известно, что TSAb способны имитировать функцию ТТГ в результате связывания с соответствующим рецептором и последующей стимуляцией фолликулярных клеток щитовидной железы [27, 208, 337]. Они способны усиливать функцию тиреоцитов в течение нескольких часов, тогда как сам ТТГ действует менее

продолжительно [117]. В противоположность этому, ТВАб предотвращают активацию рецептора и могут иметь значение в патогенезе атрофии железы и развитии гипотиреоза у некоторых больных с АИТ [94, 123, 349].

Несколько исследователей сообщили о последовательной фенотипической конверсии от болезни Грейвса к АИТ или наоборот [35, 60, 107]. Механизм, лежащий в основе, неясен, но может определяться следующими факторами: активностью TSAб и ТВАб, реактивностью щитовидной железы на TSAб или ТВАб и интраклеточными иммунными изменениями [8, 32, 347].

Известно, что ТПО экспрессируется на апикальной поверхности тиреоцитов, где катализирует иодирование молекулы ТГ, также, может представлять собой поверхностно-клеточный антиген, вовлекающийся в процесс комплемент-зависимой цитотоксичности [148, 240, 241]. Считается, что именно антитела к ТПО оказывают наиболее выраженное цитотоксическое действие на тиреоциты [286]. Они фиксируются на своих специфических участках связывания комплемента и тем самым определяют антителозависимую и комплемент-опосредованную цитотоксичность [159, 240, 361]. Несмотря на ожидания многих исследователей, функциональная активность антител к ТПО и их ценность в качестве прогностического маркера при болезни Грейвса оказалась неоднозначной [254, 262, 291].

Антитела к ТПО являются одним из наиболее изученных молекулярных маркеров различных тиреопатий, но представление об исключительно патогенетической роли микросомальной фракции тиреоцитов постепенно сменяется обоснованным положением о том, что присутствие аутоантител к ТПО в сыворотке крови далеко не всегда является фактором, достаточным для запуска аутоиммунного процесса [117, 162, 336].

Рядом исследователей установлено, что титр антител к ТПО при болезни Грейвса намного ниже, чем при АИТ, в результате чего минимизируются эффекты антителозависимой комплемент-опосредованной цитотоксичности [159; 291, 343]. Другие авторы утверждают, что антитела к ТПО являются наиболее чувствительным показателем аутоиммунного поражения щитовидной железы, и обнаружение

этих антител у пациентов с болезнью Грейвса доказывает его аутоиммунный генез [323].

В целом, в литературе встречаются совершенно противоречивые данные: от возможности использования мониторинга течения болезни Грейвса и прогноза заболевания до нецелесообразности определения титра антител к ТПО и отсутствия их прогностической значимости [96, 103, 114]. Тем не менее, процессы антителообразования против ТПО, участие антител к ТПО в гормональной регуляции щитовидной железы, и, особенно, Т-клеточной аутоиммунной агрессии при болезни Грейвса остаются предметом дискуссий до настоящего времени [77, 208, 267].

Недавний прогресс в понимании биохимии и функции ТПО при различных патологиях демонстрирует, что ТПО претерпевает сложные посттрансляционные модификации в виде димера в эндоплазматическом ретикулуме во время секреторного пути к апикальной мембране тиреоцитов и имеет две области активного сайта фермента и аутоантигенных детерминант [78]. Причём, при аутоиммунной гибели клеток щитовидной железы антитела к ТПО вовлечены через антителозависимые клетки цитотоксичности (ADCC) и C3-комплемент-опосредованную цитотоксичность [5, 117, 359]. Антитела к ТПО направлены преимущественно на две иммунодоминантные детерминанты (IDR), называемые областями IDR-A и IDR-B, причем антитела к IDR-B более преобладают при аутоиммунных заболеваниях [323]. Следует упомянуть и о том, что некоторые больные с системными заболеваниями соединительной ткани, как в сочетании, так и в отсутствие болезни Грейвса могут иметь повышенный титр антител к ТПО [365]. Более того, антитела к ТПО также влияют и на разнообразие эпитопов патогенных Т-клеток, снижаются в ткани рака щитовидной, что напрямую влияет на синтез тиреоидных гормонов, а также могут выполнять протективную роль в развитии рака лёгкого, молочной железы и при АИТ [94, 138, 247].

Нарушения в системе иммунорегуляции, приводящие к развитию болезни Грейвса тесно взаимосвязаны с изменениями молекулярных механизмов действия тиреоидных гормонов в условиях их гиперпродукции, а также сцепленных иммуногенетических дефектов генов HLA и значимых изменениях тиреоидных антигенов

[42, 159, 181]. В этой связи следует упомянуть и о сообщениях, которые указывают на селективный дефицит IgA, как самостоятельную форму иммунодефицита у пациентов с болезнью Грейвса, которая заключается в нарушении взаимодействия между IgA и его рецептором, что приводит к деактивации определенных путей иммунной системы и последовательной связи с дебютом гипертиреоза Грейвса [45, 202, 299]. Интересно заметить, что дефицит IgA не связан с мутациями гена IgA, а связан с HLA-гаплотипом 8.1 (HLA-A1, B8, DR3, DQ2).

Кроме того, было показано, что существенным для созревания Treg является транскрипционный фактор FOXP3, мутация которого у пациентов с болезнью Грейвса является, также самостоятельным дефектом и может усугублять синдром иммунодисрегуляции [63, 64, 67]. Интересно, что FOXP3 расположен на X-хромосоме, что может объяснять преобладание женщин в структуре пациентов с болезнью Грейвса.

Заслуживают внимания исследования закономерностей дисбаланса Th1 и Th2 в развитии органоспецифической иммунной реакции при аутоиммунных тиреопатиях [4]. Известно, что инфильтрирующие паренхиму щитовидной железы клетки иммунной системы экспрессируют рецепторы цитокинов TNF-RI, IL-2R, IL-4R, а клетки фолликулярного эпителия - только рецепторы к IL-2 и IL-4 (IL-2R, IL-4R) [8, 84, 105].

Однако, вышеуказанные изменения в экспрессии рецепторов цитокинов закономерны для аутоиммунных тиреопатий в целом и не могут быть отнесены к типовому аутоиммунному процессу при болезни Грейвса. В то же время, доказано, что увеличение экспрессии TNF- α лимфоцитами, инфильтрирующими ткань щитовидной железы, ассоциировано с онкоцитарной трансформацией фолликулярного эпителия, а гистологический вариант строения тиреоидной паренхимы при болезни Грейвса сопряжен с изменениями баланса цитокинов Th1/Th2 профиля [26].

В свою очередь, повышенная экспрессия TNF- α объясняет сходство структурно-функциональных изменений в щитовидной железе при АИТ и болезни Грейвса, но не является определяющей с учетом перестройки тиреоидного эпителия в исходе консервативного лечения антитиреоидными препаратами [60].

В отличие от АИТ, среди клеток лимфоидного инфильтрата при болезни Грейвса обнаружено преобладание лимфоцитов Th2 типа, которые секретируют цитокины, стимулирующие продукцию антител В-лимфоцитами [175].

Основополагающие исследования супернатантов культур мононуклеарных клеток (MNC) периферической крови, активированных иономицином в комбинации с форбол 12-мириостат 13-ацетатом, пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса до начала лечения анти тиреоидными препаратами показывают системный сдвиг продукции цитокинов в сторону цитокинового ответа Th2, тем самым подтверждая ключевую роль антител к рТТГ и гуморального иммунитета в патогенезе заболевания [84]. После 40-часовой инкубации концентрации продуцируемых цитокинов (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12) культуры MNC крови от пациентов с болезнью Грейвса продуцировали значительно меньше IL-12 и значительно больше IL-10 и IL-4, чем культуры от здоровых контрольных групп. Все рассчитанные соотношения цитокинов Th1 и Th2 в культурах MNC у пациентов с болезнью Грейвса были значительно ниже, чем в культурах MNC у здоровых доноров.

В то же время показано участие Th2- и Th3-клонов лимфоцитов в формировании цитокинового окружения при болезни Грейвса [282]. С учетом накопленных данных о популяциях Th-лимфоцитов в инфильтрате щитовидной железы при АИТ и болезни Грейвса формируется мнение, что при аутоиммунных тиреопатиях отсутствует выраженный сдвиг в сторону Th1 или Th2, и цитокины, присущие обоим типам Th-лимфоцитов, могут продуцироваться одновременно, а развитие иммунных процессов в щитовидной железе определяется функционально доминирующей в данный момент популяцией Th-клеток [8, 118, 182].

Более того, в литературе имеются сообщения, что в отдельных случаях встречаются пациенты с клинически подтвержденной болезнью Грейвса, у которых при микроскопическом исследовании удаленной железы обнаруживается полная перестройка тиреоидной паренхимы, характерная для АИТ [60, 94, 103]. Некоторые авторы считают, что болезнь Грейвса закономерно превращается в лимфоматозный зоб, проходя последовательно фазу пролиферации эпителия, лимфоидную инфильтрацию и склерозирование стромы железы [70, 106, 286].

Результаты недавних исследований указывают на то, что при болезни Грейвса наблюдается патогенетически значимый дисбаланс Th1/Th2 лимфоцитов, что влияет на выработку антител, реагирующих с клеточными и тканевыми компонентами щитовидной железы [126]. Было показано, что у пациентов с болезнью Грейвса уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet и Th1 (IFN- γ) в МНС периферической крови значительно повышены, в то время как уровни экспрессии мРНК GATA-связывающего белка 3 и Th2 (IL-4) были снижены. Предполагается что, помимо активации пролиферации, увеличение количества тиреоцитов при болезни Грейвса связано с замедлением их спонтанной или индуцированной гибели.

Изучение механизмов апоптотической гибели тиреоцитов выявило ограничение презентации на мембране данных клеток Fas-рецептора, что может защищать тиреоциты от воздействия FasL-экспрессирующих лимфоцитов [218]. Система Fas (CD95)/Fas-лиганд является важным регуляторным механизмом в контроле аутореактивных Т-клеток [64]. Связывание Fas-лиганда с его рецептором Fas активирует апоптоз посредством активации внутриклеточных каспаз [293]. Как и при болезни Грейвса, в случае мутаций Fas-лиганда развивается первичный иммунодефицит с лимфопролиферативным синдромом и развитием иммунологической толерантности.

Следует отметить, что была описана когорта пациентов с болезнью Грейвса, у которых был нарушен апоптоз Т-клеток после связывания Fas [315]. Возникает вопрос, почему тиреоциты при АИТ поддаются апоптозу, а при болезни Грейвса нет. Авторы объясняют это тем, что интратиреоидные Т-клетки при болезни Грейвса высвобождают факторы, ингибирующие апоптоз, такие как белок-ингибитор каспазы-8 и антиапоптотические белки Bcl.

В одном из ключевых фундаментальных исследований интратиреоидного аутоиммунитета при болезни Грейвса рассмотрели возможное участие Fas и его лиганда (FasL) в органоспецифическом иммунном ответе при болезни Грейвса [154]. Иммуногистохимический анализ показал, что процент FasL-положительных тиреоцитов в щитовидной железе у пациентов с болезнью Грейвса был меньше, чем в

нормальной щитовидной железе. При световой микроскопии авторы обнаружили несколько апоптотических тиреоцитов и инфильтрирующих MNC, а также пролиферирующие клеточные ядерные антигены, - PCNA-положительные тиреоциты. Однако апоптотические клетки, а также PCNA-позитивные клетки практически не обнаруживались в нормальной щитовидной железе.

В этом же исследовании обработка тиреоцитов *in vitro* цитокином IL-1 β , который, как было обнаружено, экспрессируется в щитовидной железе при гипертиреозе Грейвса, увеличивает Fas, но снижает экспрессию FasL. Стимулированные IL-1 β тиреоциты стали чувствительными к апоптозу под действием моноклонального антитела IgM против Fas. Активированные T-клетки, которые сильно экспрессировали FasL, проявляли цитотоксическую активность в отношении стимулированных IL-1 β тиреоцитов, но не в отношении нестимулированных тиреоцитов. Важно отметить, что стимулированные IL-1 β тиреоциты, с пониженной экспрессией FasL, не могли эффективно убивать активированные T-клетки путем апоптоза, а цитотоксическая активность нестимулированных тиреоцитов, по отношению к активированным T-клеткам, подавлялась анти-FasL. Таким образом, это фундаментальное исследование показало, что апоптотическая гибель клеток, как тиреоцитов, так и инфильтрирующих MNC, обнаруженных в щитовидной железе у пациентов с болезнью Грейвса, регулируется IL-1 β посредством взаимодействия Fas/FasL.

Доказано, что презентация аутоантигена при болезни Грейвса осуществляется моноцитами, макрофагами и дендритными клетками, причем сами тиреоциты экспрессируют HLA-DR и могут выступать антигенпрезентирующей клеткой после инфильтрации железы сенсibilизированными, и активированными Th-клетками [22, 99, 138]. Экспериментальное исследования при стимуляции IL-2 с использованием моноклональных видоспецифических антител к CD86 и триптазе щитовидной железы крыс Вистар с тиреотоксикозом выявили наличие клеток врожденного иммунитета – мастоцитов в соединительной ткани щитовидной железы [10]. Авторы утверждают, что мастоциты могут участвовать в антигенпрезентации при аутоиммунных тиреопатиях, экспрессируя костимулирующие молекулы (CD86) при изменении системной концентрации тиреоидных гормонов.

Однако, аутоиммунный процесс при болезни Грейвса запускается после кооперации антигенпрезентирующих клеток с инфильтрирующими щитовидную железу сенсibilизированными и активированными Th-клетками, а гипертиреоз развивается уже после начала иммунной атаки [262, 322, 356].

T-лимфоциты играют центральную роль в развитии болезни Грейвса [100]. Во многих работах показано, что главным образом CD4⁺-клетки пациентов с аутоиммунными тиреопатиями сенсibilизированы к интактным тиреоцитам или отдельным тиреоидным антигенам [77, 89, 102]. Особый интерес проявляется к проблеме участия в иммунопатогенезе болезни Грейвса лишь какого-то одного или немногих клонов T-клеток, различающихся поверхностными рецепторами, о чем свидетельствуют ограниченное число специфичностей V-генов T-клеточных рецепторов (ТкР) на аутореактивных T-лимфоцитах. В частности, группа авторов обнаружила ограниченную вариабельность V^α - и V^β- генов ТкР в интратиреоидных T-клетках пациентов с болезнью Грейвса [143].

В иммунопатогенезе болезни Грейвса принимают участие и лимфоцитарные антигены (LFA-1, LFA-2, LFA-3), играющие роль добавочных молекул и способствующих связыванию T-клеток с антигенпрезентирующей клеткой [129, 164, 231]. Экспрессируемые тиреоцитами при болезни Грейвса ICAM-1 и hsp-72 взаимодействуют с LFA-1, усиливая активацию лимфоцитов [308]. Эти белки исчезают при пересадке пораженной аутоиммунным процессом тиреоидной ткани голым мышам, что доказывает вторичность их появления.

Популяционный состав и функция T-клеток периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса рассматривается отдельно для CD4⁺- и CD8⁺- клеток, поскольку экспрессия этих активационных маркеров резко различается и часто меняется в противоположных направлениях [77]. Также, было показано, что тиреоидные гормоны и ТПО активируют CD8⁺- клетки пациентов с болезнью Грейвса значительно слабее, чем соответствующие клетки здоровых доноров [150]. Более того, антиген рТТГ гораздо слабее активирует CD8⁺-клетки пациентов с болезнью Грейвса, чем контрольные CD8⁺-клетки от здоровых лиц, пациентов с АИТ, нетоксическим зобом и сахарным диабетом 1 типа [308].

Поскольку убедительные данные об изменениях тиреоидных антигенов отсутствуют, болезнь Грейвса сегодня относят к заболеваниям, в основе которого лежит первичное нарушение иммунорегуляции – дефект Treg, при котором дисфункция органа обуславливается агрессией недостаточно супрессированных Th1-и Th2-клеток [46, 279, 370].

Данные о состоянии субпопуляционного состава лимфоцитов крови при болезни Грейвса противоречивы. Описывается дефект субпопуляции NK-клеток, который проявляется как снижением спонтанной и стимулированной IL-2 и интерферон 1 β цитотоксичности, так и нарушением выработки данными клетками цитокинов, в частности TNF- α [121]. В других исследованиях указывается как на снижение количества Th-клеток, так и цитотоксических T-лимфоцитов и повышение числа NK-клеток, так и отсутствие изменений со стороны данных показателей [105, 141, 197]. Ряд современных данных указывает на то, что органоспецифические нарушения при болезни Грейвса являются следствием первичного дефекта Treg, иммунопатогенетические аспекты которого требуют дальнейших исследований [43, 120, 171].

Расширение знаний о роли Treg и дефекте их супрессорной функции, а также их фенотипическая изменчивость, и высокая конститутивная экспрессия поверхностного маркера CD25, т.е. рецептора для IL-2R, имеют решающее значение в раскрытии механизмов прогрессирования аутоиммунного процесса при болезни Грейвса [77]. Однако, остаются неизученными закономерности изменения фенотипического состава T-лимфоцитов в периферической крови и в ткани щитовидной железы в аспекте длительного консервативного лечения тиамазолом. Обнаружено, что при болезни Грейвса количество Treg в крови снижается [204, 279, 280].

Но, механизмы поддержания дефекта Treg и связанной с ним чрезмерной активацией специфических Th-клеток, а также регуляции функциональной активности B-лимфоцитов изучены не полностью [258, 269, 274]. В связи с тем, что в основе болезни Грейвса лежит органоспецифический аутоиммунный процесс, то иммунологические механизмы прогрессирования аутоиммунного процесса должны быть охарактеризованы в сравнительном аспекте – в крови и ткани щитовидной железы.

Остаются до сих пор неизвестными влияния консервативной терапии тиамазолом, а также радионуклидного и хирургического лечения на дефект недостаточной активации Treg и состояние регуляторных механизмов в иммунной системе пациентов с болезнью Грейвса после проведенной терапии [171, 220, 224].

Многие авторы указывают на то, что дефект регуляторной функции различных субпопуляций Treg при болезни Грейвса требует существенного уточнения и расширения [5, 101, 279]. Учитывая неудовлетворительные результаты консервативной терапии антитиреоидными препаратами у пациентов с болезнью Грейвса, появилась острая необходимость в изучении дефекта Treg в динамике после радикальных методов лечения для разработки новых способов лечения, нацеленных на лежащие в основе заболевания иммунные факторы [140, 265, 373]. В связи с этим, эффективный контроль аутоиммунного процесса при болезни Грейвса предопределяет необходимость уточнения иммунологических критериев прогрессирования заболевания, в том числе, на фоне консервативной терапии тиамазолом и в динамике после радионуклидного, и оперативного лечения для разработки современной стратегии иммуотропной терапии заболевания.

Признание аутоиммунной природы болезни Грейвса определило поиски наиболее информативных маркеров, участвующих в реакциях гуморального и клеточного иммунитета [183, 197, 237]. Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофилы являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками врожденного иммунитета и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [18, 121, 170]. Нейтрофилы обладают мощным рецепторным потенциалом, обеспечивающим сигнализацию между собой и клетками иммунной системы, а также с клетками эндотелия, эпителия и других тканей. Нейтрофилы являются ключевыми клетками воспаления [232]. Роль нейтрофилов в иммунопатогенезе болезни Грейвса остается малоизученной. Известно, что нейтрофилы способны оказывать иммуnoreгуляторное действие посредством секреции ряда цитокинов, избыточная продукция которых является фактором гиперактивации интратиреоидного воспалительного процесса [23, 170, 183].

Вовлечение нейтрофилов в процесс деструкции щитовидной железы сопровождается усилением потребления клетками кислорода и продукцией его токсичных метаболитов, что в условиях дефекта механизмов антиоксидантной защиты может служить причиной включения летальной программы тиреоидных клеток, равно как и самих полиморфноядерных лейкоцитов [3, 173, 182]. Реакции нейтрофилов, направленные на локализацию и элиминацию антигена, зависят во многом от силы и времени антигенного воздействия на иммунную систему и исходного уровня функциональной активности клеток [236]. При болезни Грейвса нейтрофилы активно вовлечены в иммунопатогенез заболевания, повышена их «предуготовленность» к апоптозу на фоне выраженных изменений цитокинового профиля периферической крови [3, 89, 235].

Фундаментальные и клинические исследования последних лет свидетельствуют о том, что избыточная секреция гормонов щитовидной железы при тиреотоксикозе аутоиммунного генеза создает гиперметаболическое состояние, характеризующееся насыщением физиологических антиоксидантных систем за счет высокого потребления внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и кислорода, разобщением дыхательной цепи митохондрий, дисфункция которой способствует выработке активных форм кислорода (АФК) в периферических тканях и в щитовидной железе и вызывает оксидативный стресс у пациентов с болезнью Грейвса [123, 251; 283]. Известно, что дисмутация двух молекул O_2^- приводит к образованию перекиси водорода (H_2O_2), взаимодействие которого с O_2^- приводит к появлению гидроперикисных радикалов, способных продолжать цепь свободнорадикального окисления в составе фосфолипидных клеточных мембран, нарушая целостность границ клеточных компартментов и плазматической мембраны [233, 226, 250]. Было показано, что оксидативный стресс лежит в основе патологического изменения активности целого комплекса Ca^{2+} -активируемых ферментных систем, а также систем трансмембранного транспорта и активации ряда транскрипционных факторов [130, 225, 326].

Окислительно-восстановительный дисбаланс при гипертиреозе аутоиммунного генеза вызывает адаптацию антиоксидантных систем, индуцируя

активацию внеклеточных сигнально-регулируемых киназ 1 (ERK1) и ERK2, а также сигнальных путей протеинкиназы В, и генов позднего ответа JUN/FOS, что приводит к гипертрофии миокарда, которая развивается уже после четырех недель тиреотоксикоза [137]. К настоящему времени точная роль и место АФК в развитии иммунной атаки при болезни Грейвса не полностью выяснены [155, 216, 303]. Хотя эта проблема интенсивно изучается, не определены интегративные взаимодействия окислительно-восстановительных нарушений и активационных маркеров лимфоцитов, экспрессирующихся, как на лимфоцитах, инфильтрирующих ткань железы, так и на клетках иммунной системы периферической крови, что может не только играть центральную роль в поддержании аутоиммунного процесса и рецидивировании заболевания, но и являться потенциальным вектором иммуностропной терапии заболевания [69, 274, 298].

До сих пор остается неизученной радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике оперативного и радионуклидного лечения. Однако, функционирование НАДФН-оксидазного комплекса и интенсивность метаболических процессов в нейтрофилах периферической крови может определять их функциональные возможности при развитии и последующем поддержании аутоиммунной реакции [62, 90, 359].

Известно, что одним из наиболее ранних проявлений повреждения клеток при гипертиреозе аутоиммунного генеза является нарушение энергообразовательной функции и активности внутриклеточных ферментов митохондрий [228, 229, 358]. Причем, это может быть связано, как с самим гипертиреозом, так и с повреждением митохондриальных мембран клеток вследствие активации перекисного окисления входящих в их состав липидных молекул [48, 155, 277].

С другой стороны, тиреоидные гормоны активируют аэробное дыхание и внутриклеточный белковый обмен, а также разобщают процесс окислительного фосфорилирования [31, 111, 196]. Кроме того, активность некоторых внутриклеточных дегидрогеназ находится под контролем тиреоидных гормонов [86, 88, 354]. Следует подчеркнуть, что изменение активности основных метаболических процессов, таких, как гликолиз, пентозофосфатный цикл, цикл трикарбоновых кислот

(ЦТК) в клетках определяется типом функционально-регуляторного сигнала и не зависит от популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов [61]. В связи с этим, одним из важнейших аспектов аутоиммунного процесса при болезни Грейвса является характеристика состояния окислительно-восстановительных реакций и уровня активности ключевых ферментов клеток иммунной системы не только в дебюте и при рецидиве заболевания, но и в динамике после различных методов лечения.

Таким образом, к настоящему времени, до конца неясны механизмы прогрессирования аутоиммунного процесса при болезни Грейвса. В частности, не изучены иммунологические аспекты повторного срыва толерантности к собственным антигенам щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса с развитием рецидива гипертиреоза, а также участия в этом процессе периферических клеток иммунной системы и интра tireоидных лимфоцитов, что существенно затрудняет разработку этиотропных подходов к лечению заболевания.

1.3. Молекулярные и иммуномодулирующие механизмы консервативной терапии болезни Грейвса

К настоящему времени удалось показать, что влияние высоких доз анти tireоидных препаратов на ряд иммунологических параметров не отличается от действия низких доз этих лекарственных средств, а основным фактором, от которого зависит течение аутоиммунного процесса, является гипертиреоз [81, 87, 189]. Такое влияние анти tireоидных препаратов на клетки щитовидной железы, нормализующих ее функцию и восстанавливающих эутиреоз, не объясняет механизм персистенции иммунной реакции, хотя и препятствует стимулирующему действию ТТГ [66, 113, 254].

По современным представлениям иммуномодулирующие механизмы консервативной терапии при болезни Грейвса во многом определяются ликвидацией гипертиреоза [297, 195, 321]. В этой связи необходимо остановиться на особенностях молекулярного действия тиреоидных гормонов, так как их гиперпродукция тесно

связана с реализацией дефекта иммунологической толерантности при болезни Грейвса [252]. Тиреоидным гормонам принадлежит существенная роль в регуляции разнообразных физиологических и клеточных функций [316, 334, 346]. Хорошо известно, что тиреоидные гормоны 3,3',5-L-трийодтиронин (Т3) и L-тетрайодтиронин (Т4) играют ключевую роль в процессах роста, развития и обмена веществ в целом [5, 149, 369]. Попав в клетку, тиреоидные гормоны проникают в ядро, где с высоким сродством и специфичностью связываются с ядерными рецепторами тиреоидных гормонов [333, 345, 361]. Хотя многие эффекты тиреоидных гормонов – следствие регуляции экспрессии генов, они могут влиять и на плазматическую мембрану, цитоплазму, митохондрии и другие внеядерные клеточные структуры [176].

Было показано, что тиреоидные гормоны и коактиватор стероидных рецепторов-1 (SRC-1) взаимодействуют с недавно обнаруженным коактиватором сигнальной системы цАМФ, носящим название CREB-связывающий белок [151]. Таким образом, SRC-1 и CREB-связывающий белок могут действовать совместно с тиреоидными гормонами еще более усиливая их эффекты, обуславливая конвергенцию двух основных сигнальных систем в клетке: одной, реализуемой через плазматическую мембрану, и второй – через ядерные рецепторы. Это создает возможность множества взаимодействий на путях реализации эффектов обеих систем.

Большинство работ в области экспериментальной тиреоидологии, особенно в течение последнего десятилетия, было направлено на детализацию молекулярных механизмов действия тиреоидных гормонов на транскрипцию генов [71, 227, 369].

Как показано, свободные тиреоидные гормоны проникают из крови в клетки путем пассивной диффузии, либо какими-то иными, пока недостаточно изученными путями [361]. Внутриклеточные эффекты тиреоидных гормонов тесно связаны с механизмами дейодирования [104]. Самым важным из таких превращений является конверсия под действием 5'-дейодиназ Т4 в биологически более активный Т3, причем Т4 и Т3 подвергаются дальнейшей внутриклеточной инактивации [287]. Следует подчеркнуть, что именно Т3 поступает в ядро клетки и связывается с рецептором тиреоидных гормонов [288]. Тиреоидный рецептор образует гетеродимеры со многими другими ядерными белками, в том числе CREB-связывающим бел-

ком, и эти гетеродимеры взаимодействуют с определенными участками ДНК, так называемыми тиреод-чувствительными элементами (TREs) [58]. Образующийся комплекс влияет на экспрессию TREs-содержащих генов, что в свою очередь изменяет синтез соответствующих мРНК и белков.

Известно, что тиреоидные гормоны активируют аэробное дыхание и внутриклеточный белковый обмен, а также разобщают процесс окислительного фосфорилирования [31, 58, 210]. Известна способность тиреоидных гормонов стимулировать тканевое дыхание за счет повышения активности АДФ-АТФ, вследствие чего ускоряется поглощение митохондриями АДФ, активировать ЦТК с увеличением количества доноров электронов, усилить поглощение фосфата, а также стимулировать АТФ-синтазу и перенос электронов по дыхательной цепи [122]. Кроме того, активность некоторых дегидрогеназ находится под контролем тиреоидных гормонов [71]. Доказано влияние тиреоидных гормонов и ТТГ на клетки иммунной системы лимфоидного ряда через их специфические мембранные и ядерные рецепторы гормонов [33, 334, 354].

Внутриядерный механизм действия тиреоидных гормонов основан на их способности изменять экспрессию ряда генов [149, 210, 335]. К ним относятся гены, определяющие различные биохимические процессы и клеточные функции, включая глюконеогенез, липогенез, проведение внутриклеточных сигналов, пролиферацию и апоптоз. Негеномные эффекты тиреоидных гормонов осуществляются без участия ядерных рецепторов и включают транспорт аминокислот, глюкозы, катионов через плазматическую мембрану клетки, презентацию на клеточной поверхности молекул, принимающих участие в метаболизме и ключевых биохимических процессах, протекающих в цитоплазме [151]. Эти эффекты опосредуются влиянием тиреоидных гормонов на разные органеллы, специализированные функции плазматической мембраны, биохимические процессы, протекающие в цитоплазме.

Негеномные эффекты тиреоидных гормонов характеризуются не только своей независимостью от рецепторов, но и рядом качественных особенностей, которые отличают их от эффектов, опосредуемых ядром клетки [5, 115, 287].

К ним относятся иные структурно-функциональные отношения. В частности, большую, чем у Т3, активность Т4 и 3,3',5'L-трийодтиронина (реверсированный Т3) в отношении ряда негеномных функций, а в некоторых случаях проявление эффекта уже через секунды или минуты [352]. Учитывая неоднозначность воздействия тиреоидных гормонов на клетки иммунной системы, изменение внутриклеточного метаболизма в дебюте болезни Грейвса может предопределять механизмы поддержания аутоиммунного процесса. В связи с чем, наиболее важным является получение новых данных о механизмах развития и прогрессирования аутоиммунного процесса, а также выявление клинико-иммунологических маркеров для мониторинга и прогнозирования длительной консервативной терапии в дебюте заболевания.

В некоторых случаях на пути между предполагаемым рецептором и негеномным эффектом участвуют сложно взаимодействующие друг с другом компоненты систем передачи сигналов в клетку, но не исключается возможность их опосредования и геномными механизмами [202, 333, 369]. Кроме того, известно, что эффект тиреоидных гормонов на иммунную систему реализуется в избирательном угнетении образования антигенспецифичных цитотоксических Т-лимфоцитов и в стимулировании накопления Th-клеток ($CD4^+$), а ТТГ активирует синтез и освобождение ИЛ-2 из лимфоцитов периферической крови [33, 78, 228]. Природа иммуносупрессивного эффекта антитиреоидных препаратов тесно связана с их тиреостатическим действием и является предметом дискуссий до настоящего времени [81, 87, 344]. Иммуносупрессивное воздействие антитиреоидных препаратов реализуется на интратиреоидном и экстратиреоидном уровнях [109, 215, 274].

Доказано, что антитиреоидные препараты оказывают прямое воздействие на иммунную систему, хотя все авторы подчеркивают, что в первую очередь препараты влияют на клетки щитовидной железы с последующим снижением передачи сигналов между тиреоцитами и иммунными клетками [81, 87, 93]. Это может быть вызвано снижением выработки гормонов щитовидной железы и/или снижением презентации антигена тиреоцитами интратиреоидными Т-лимфоцитам.

Изучение биоптатов щитовидных желез пациентов с болезнью Грейвса, получающих метимазол до хирургического лечения показало истощение по числу ин-

тратиреоидных лимфоцитов в сравнении с пациентами получающими только пропранолол [175].

Гипотеза о возможном иммуносупрессивном действии антитиреоидных препаратов впервые была изучена *in vivo* путем создания модели спонтанного тиреоидита человека на крысах штамма Buffalo с тиреоидитом, вызванным неонатальной тимэктомией [95]. Было показано, что метимазол оказывает прямое действие на аутоиммунный процесс, в частности, на лимфоцитарный инфильтрат щитовидной железы. Позднее было показано, что метимазол уменьшает содержание ICAM-1, угнетает высвобождение простогландина E_7 , IL-1 β , растворимых рецепторов IL-2 и IL-6 из тиреоцитов [311].

Описаны такие иммуномодулирующие эффекты метимазола, как снижение внутриклеточных молекул адгезии, растворимых рецепторов IL-2 и IL-6, а также экспрессии антигенов HLA II класса на поверхности фолликулярных клеток щитовидной железы [53, 132, 360]. Показано ингибирующее действие антитиреоидных препаратов на интратиреоидную лимфоцитарную трансформацию, миграцию моноцитов и нейтрофилов [153]. Считается, что снижение содержания медиаторов воспаления уменьшает лимфатическую инфильтрацию щитовидной железы и последующее образование антитиреоидных антител, в том числе и TSAb [87].

В то же время, имеются убедительные данные о том, что ремиссия, индуцированная приемом антитиреоидных препаратов у некоторых пациентов с болезнью Грейвса способствует активации аутоиммунного процесса, характерного для АИТ, а высокий титр общей фракции антител к рТТГ в этом случае обусловлен преимущественно TBAb [36, 60, 182].

Другие авторы утверждают, что при болезни Грейвса соответствие между степенью функциональной активности щитовидной железы и структурной реакцией ее тиреоидной паренхимы слабо выражено [315]. Имеются противоречивые сообщения о том, что антитиреоидные препараты снижают уровень показателей окислительного стресса за счет восстановления эутиреоза и общего реактивного антиоксидантного потенциала плазмы [69]. С другой стороны, более поздними исследованиями показано снижение общей антиоксидантной способности у пациен-

тов со средней продолжительностью гипертиреоза $2,3 \pm 1,5$ месяца [142]. Имеются единичные публикации исследований, проведенных у пациентов с болезнью Грейвса до, и в динамике лечения антитиреоидными препаратами, которые демонстрируют, что уже через три месяца от начала терапии тионамидными препаратами ингибируется образование кислородных радикалов и снижается экспрессия отрицательного регуляторного белка остеопонтина [309].

Однако, в литературе отсутствуют исследования количественной оценки пула первичных и вторичных АФК, а также кинетики их образования в зависимости от компенсации гипертиреоза при консервативном лечении болезни Грейвса, что представляется особенно значимым в клиническом аспекте поддержания аутоиммунного воспаления при рецидиве заболевания.

Несмотря на многолетний анализ большого материала по морфологической ультраструктуре щитовидной железы при болезни Грейвса до сих пор не удалось установить достоверной связи между степенью лимфоидной инфильтрации и развитием медикаментозного эутиреоза, индуцированного антитиреоидными препаратами, самопроизвольной ремиссии или трансформации в АИТ [38, 135, 329]. Отсутствие связи с длительностью лечения антитиреоидными препаратами и степенью компенсации гипертиреоза создают сложности не только при микроскопическом описании щитовидной железы, но и в интерпретации изменений интратиреоидных иммунных реакций в исходе консервативного лечения заболевания [41, 168, 262].

Кроме того, морфологические исследования желез пациентов, не получавших антитиреоидные препараты, также показали многообразие морфологических форм [5, 70, 219].

Фундаментальные исследования с использованием системы анализа цитотоксичности моноклональными антителами против ТПО и HLA-DR, и комплементом на культивируемых нормальных клетках щитовидной железы человека показали, что добавление антитиреоидного препарата метимазола в различных концентрациях в дополнение к другим стимуляторам, IFN- γ , ТТГ или антител к рТТГ, не приводило к какому-либо ингибированию ТПО, высвобождению ТГ или экспрессии HLA-DR в клетках щитовидной железы [198]. Авторы заключили, что метимазол

не вызывает прямого иммуносупрессивного эффекта за счет какого-либо снижения экспрессии или высвобождения антигена щитовидной железы. Позднее появляются доказательства, что метимазол может влиять на В-клетки и, возможно, функцию вспомогательных клеток, но не оказывает какого-либо влияния на пролиферацию Т-клеток *in vitro*, независимо от рассматриваемого пути активации [311].

Кроме того, препарат практически не влиял на продукцию IL-2 и IFN- γ , а также на продукцию IL-1. Однако наблюдалось незначительное снижение экспрессии рецептора IL-2, индуцированного стимуляцией фитогемагглютинином. Авторами не исключается гипотеза о влиянии метимазола на некоторые специализированные функции Т-клеток, но вполне вероятно, что предполагаемый иммуносупрессивный эффект антитиреодных препаратов не связан с Т-лимфоцитами.

В последующем, иммуногистохимическое исследование аспириатов щитовидной железы пациентов с болезнью Грейвса и образцов здоровой ткани показало, что антитиреодные препараты могут усиливать экспрессию FasL на мембране тиреоцитов с последующей активацией Fas-индуцированного апоптоза этих клеток [153]. Причем, было обнаружено, что обработанные метимазолом в условиях *in vitro* тиреоциты индуцировали FasL-зависимый апоптоз в культивируемых лимфоцитах, в то время как обработка метимазолом лимфоцитов, выращенных в отсутствие тиреоцитов не оказывала такого эффекта. Таким образом, FasL высоко экспрессируется в фолликулярных клетках щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса, получающих антитиреодные препараты и может способствовать прямому иммуномодулирующему эффекту тионамидов.

Исследованиями последних лет показано, что тиреоидные антигены активируют цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD8⁺) пациентов с болезнью Грейвса значительно слабее, чем соответствующие клетки здоровых доноров [120]. В более поздних работах сообщается, что антиген рТТГ гораздо слабее активирует CD3⁺CD8⁺-клетки больных болезнью Грейвса, чем CD3⁺CD8⁺-лимфоциты здоровых лиц, больных хроническим аутоиммунным тиреоидитом, нетоксическим зобом и сахарным диабетом 1 типа [315]. Изучение соотношения хемокинов CXCR3/CCR4, указывающее на баланс Th1/Th2, показало значительное снижение вышеуказанного

соотношения после лечения метимазолом, по сравнению с исходным уровнем, причем соотношение было значительно ниже на 24-й, чем на 12-й неделе лечения [81]. Авторы делают вывод о том, что при лечении антитиреоидными препаратами происходит постепенный переход от доминирования Th1 к доминированию Th2 иммунного ответа.

Ряд современных данных указывает на первичный дефект в снижении количества и функции неспецифических Treg в гипертиреоидной фазе болезни Грейвса, преодоление которого происходит по мере развития медикаментозного эутиреоза и нормализации соотношения Th1/Th2 [319, 320, 322]. Однако взгляды специалистов по этому вопросу противоречивы. Многие авторы утверждают, что в основе рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса лежит частичное сохранение нарушенной генерализованной и антигенспецифичной супрессорной функции регуляторных Treg, которая не зависит от гипер-, гипо- или эутиреоидного состояния больных [275, 279, 280]. Имеются данные об улучшении регуляторной функции активированных Treg при длительной комбинированной терапии метимазолом и левотироксином при болезни Грейвса [255].

Вопрос о том, зависит ли иммунологическая ремиссия при болезни Грейвса от прямого иммуномодулирующего эффекта тионамидов, влияющих на сам аутоиммунный процесс, или это связано с интратиреоидной блокадой продукции тиреоидных гормонов, остается спорным [254, 267, 340]. Показано, что антитиреоидные препараты снижают уровень тиреоидных гормонов, что уже вторично уменьшает презентацию антигенов тиреоцитов интратиреоидным Т-лимфоцитам и тем самым продукцию антител к рецептору ТТГ [42]. Согласно последним утверждениям, доказанное блокирующее влияние метимазола на образование антител к рТТГ и снижение их титра в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения подчеркивает преимущество органоспецифического иммуномодулирующего эффекта антитиреоидных препаратов над системным [57].

Но, все исследователи сходятся во мнении, что любые изменения в иммунной системе, которые могут быть связаны с терапией антитиреоидными препаратами у

пациентов с болезнью Грейвса должны быть интерпретированы только при компенсации гипертиреоза [136, 254, 360].

В литературе высказываются предположения о том, что антитиреоидные препараты могут ингибировать образование свободных радикалов на клетках иммунной системы и, таким образом, снижать активность аутоиммунного процесса [69, 156, 160]. Образование АФК, которые играют чрезвычайно важную роль в Т-клеточном ответе и комплемент-индуцированной цитотоксичности клеток иммунной системы, может ингибироваться при болезни Грейвса при приеме метимазола [72, 222, 362]. В то же время, другие авторы обнаружили увеличение супероксид-дисмутазы и каталазы в плазме крови у пациентов с болезнью Грейвса с короткой продолжительностью (1-2 месяца) лечения метимазолом по сравнению со здоровыми субъектами, при этом ожидаемое увеличение антиоксидантных ферментов не происходило, напротив, уровни глутатионпероксидазы и ГР были снижены [69]. Очевидно, что активная дисмутация свободных радикалов при гипертиреозе аутоиммунного генеза играет значительную роль в рецидивирующем течении болезни Грейвса, в то время, как развитие эутиреоза снижает избыточную экспрессию и гиперреактивность системы генерирующей H_2O_2 через ингибирование тиреоспецифических белков, принадлежащих к семейству НАДФ-оксидаз [233].

При измерении конъюгированных диенов (КД), малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа в сыворотке крови у нескольких пациентов с болезнью Грейвса при лечении метимазолом была показана нормализация соотношения КД/ЛПНП и КД/МДА, что свидетельствует о восстановлении скорости перекисного окисления липидов при достижении стабильного эутиреоза на фоне тионамидной терапии [52]. При изучении параметров окислительного стресса у пациентов с болезнью Грейвса наблюдали снижение уровня МДА в сыворотке крови, но отмечали отсутствие изменений концентрации ишемически модифицированного альбумина после лечения метимазолом и пропилтиоурацилом [192]. В недавнем исследовании у 51 пациента с болезнью Грейвса при достижении стабильного эутиреоза в течение не менее 12 месяцев оценивали маркеры окислительного стресса по экскреции с мочой окисленных видов гуанозина, 8-оксо-7,8-дигидрогуанозина и 8-

оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина, полученных из РНК и ДНК соответственно [344]. Авторы показали, что восстановление эутиреоза на фоне приема метимазола у пациентов с гипертиреозом Грейвса на 10-25% снижает нагрузку системного окислительного стресса. Однако, появляются современные данные о том, что фенотип повышенной базальной продукции митохондриальных АФК в эутиреоидную фазу болезни Грейвса, может быть связан и с токсическим эффектом длительного лечения метимазолом, усиливающего окислительно-восстановительного дисбаланс [212].

В некоторых работах, также, показано, что у пациентов, принимавших анти-тиреоидные препараты, снижается активность НК-клеток и ингибируется образование кислородных радикалов, что может иметь важное клиническое значение, так как уровень АФК и инициация иммунного ответа тесно связаны [270].

В то же время, до сих пор отсутствуют исследования количественной оценки пула первичных и вторичных АФК, кинетики их образования и возможного ингибирования клеточно-опосредованного иммунитета в разрезе уровня активности внутриклеточных ферментов клеток иммунной системы, как в дебюте болезни Грейвса, так и в зависимости от компенсации гипертиреоза при терапии анти-тиреоидными препаратами, и в динамике после различных методов лечения заболевания, что представляется особенно значимым в клиническом аспекте поддержания аутоиммунного процесса, прогнозировании рецидива и эффективности длительной консервативной терапии заболевания.

1.4. Эффективность тиреоидэктомии и радионуклидной терапии в этиотропных подходах к лечению болезни Грейвса

Радикальное лечение болезни Грейвса подразумевает полное устранение функционирующей паренхимы щитовидной железы с помощью хирургического вмешательства или терапии радиоактивным йодом (РЙТ) [254, 343, 373].

При воздействии радиоактивного йода (^{131}I) короткие β - и γ -лучи дают изолированное внутреннее облучение ткани железы, вызывая в зависимости от применяемых доз деструктивные изменения в тиреоидной ткани или действуют на фер-

ментные системы, не приводя к грубым морфологическим изменениям [21, 124, 302]. В основном, ионизирующие β -частицы проникают на глубину 1-2 мм, вызывая деструкцию фолликулярных клеток щитовидной железы [82].

Глубина проникновения изотопа в щитовидную железу превышает диаметр тиреоцитов и соседние клетки оказываются под воздействием облучения, даже если они не концентрируют ^{131}I [98]. Радионуклидное лечение вызывает некроз тиреоцитов, что провоцирует воспалительный процесс, приводящий к фиброзу тиреоидной паренхимы [193, 367]. Гистологически некроз тиреоцитов и воспалительные изменения стромы железы напоминают морфологические изменения тиреоцитов при карциноме щитовидной железы [244].

Сообщается, что, терапия ^{131}I имеет низкую частоту истинной иммунологической ремиссии заболевания и повышает риск манифестации орбитопатии при болезни Грейвса, в том числе и у пациентов с отсутствием в анамнезе тиреотоксического экзофтальма и характерных изменений ретробульбарной клетчатки и орбитальных мышц [68, 114, 218]. Длительно сохраняющийся повышенный уровень TSAб, в последующем сменяющийся фракцией TBAб в сыворотке крови пациентов с болезнью Грейвса, в динамике радионуклидного лечения является единственным изученным механизмом адаптации иммунной системы после лечения ^{131}I до настоящего времени и мало что меняет в терапевтических подходах к этому заболеванию [6, 133, 367].

Однако, механизмы развития иммунологической ремиссии болезни Грейвса после радионуклидного лечения активно обсуждаются в течение последних нескольких лет. Система аутоиммунитета против рТТГ является ключевым звеном патогенеза болезни Грейвса, а количественное определение титра антител к рТТГ единственным маркером рецидива и эффективности лечения заболевания в клинической практике [242, 248, 348]. Доказано, что в зависимости от вида лечения болезни Грейвса изменяется количественный и качественный состав антител к рТТГ и, соответственно, направленность аутоиммунного процесса [109].

К настоящему времени имеются сообщения, что уровень антител к рТТГ и ТПО нарастает в течение первого года после лечения ^{131}I , а затем прогрессивно

снижается [312]. При этом, у половины пациентов через год после РЙТ сохраняются повышенными уровни ТВАб.

Динамика изменения антител к рТТГ после радионуклидного лечения при болезни Грейвса хорошо изучена [98, 193, 350]. Сразу после приема ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса отмечается увеличение титра антител к рТТГ в периферической крови и достигает максимального уровня к третьему месяцу пострadiационного периода. За этим пиком следует постепенное падение, а через год среднее значение уровня антител к рТТГ в сыворотке крови пациентов с болезнью Грейвса возвращается к уровню до лечения. Впоследствии, значения антител к рТТГ продолжают снижаться, но медленно, а средние показатели их уровня в периферической крови остаются выше нормы в течение последующих пяти лет наблюдения. Причем, некоторые авторы подчеркивают, что доля негативных по антителам к рТТГ пациентов в исходе пятилетнего периода наблюдения после радионуклидного лечения существенно ниже, чем в отдаленной динамике после консервативного и оперативного лечения [85]. Известно, что радионуклидное лечение вызывает временное повышение антител к рТТГ в сыворотке крови пациентов с болезнью Грейвса, предположительно вызванное высвобождением тиреоидных антигенов, но этот ответ на РЙТ не сравнивался в исследованиях с ответом на консервативное и оперативное лечение [327]. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что аутоиммунная активность при болезни Грейвса значительно выше в ранний пострadiационный период, чем после других видов терапии, а также о том, что у меньшего числа пациентов после лечения ^{131}I наступает иммунологическая ремиссия заболевания с исчезновением антител к рТТГ из сыворотки крови при длительном наблюдении [248].

У большинства пациентов с болезнью Грейвса после консервативного и оперативного лечения ремиссия заболевания наступает постепенно и связана с уменьшением циркулирующих антител к рТТГ, без различий между видами терапии [73, 205]. Иммунологическая ремиссия болезни Грейвса после радионуклидной терапии встречается реже и наступает намного позже, чем после консервативного и оперативного лечения [85, 186, 341].

Некоторые авторы утверждают, что дозиметрическое планирование при лечении болезни Грейвса ^{131}I существенно снижает процент пациентов с положительными титрами антител к рТТГ, ТПО и, соответственно, риском рецидива заболевания [98, 189, 342]. Как обсуждалось ранее, состояние гипертиреоза может каким-то образом поддерживать аутоиммунный процесс и усиливать аномалию специфических Treg [61, 280, 356]. В этой связи транзиторный тиреотоксикоз, который часто развивается в первые недели после радионуклидного лечения, а также рецидив гипертиреоза Грейвса спустя шесть месяцев после РЙТ могут объяснять поддержание аутоиммунного процесса в динамике после лечения ^{131}I и препятствовать формированию иммунологической ремиссии заболевания [72, 258, 273]. Однако, иммунопатогенетические механизмы персистенции этого процесса до сих пор не выяснены. Более того, есть предположение, что развитие пострадиационного гипотиреоза при болезни Грейвса, определяющего эффективность радионуклидного лечения, является результатом трансформации болезни Грейвса в АИТ [318]. Было обнаружено, что у некоторых пациентов с болезнью Грейвса после лечения ^{131}I существует период, в течение которого TSAb и TBAb циркулируют одновременно, в равновесных концентрациях, а патогенетические механизмы, ответственные за последующее изменение пропорции TSAb и TBAb остаются неизученными [261, 312].

Предполагается, что терапия ^{131}I вызывает повреждение тиреоцитов у пациентов с болезнью Грейвса, что приводит к высвобождению антигенов щитовидной железы, включая голорецептор рТТГ и другие антигены, дополнительно вызывая аутоиммунный ответ и выработку TBAb, и других аутоантител против антигенов щитовидной железы [313]. Причем, авторы подчеркивают, что у некоторых пациентов с болезнью Грейвса, повышенный уровень TBAb может сохраняться в течение двух лет после лечения ^{131}I . Большинство авторов первостепенным считают нарушение соотношения титра циркулирующих антител к рТТГ, а изучая вопрос их продолжающейся циркуляции, сходятся во мнении о необходимости более детальных исследований системы клеточного и гуморального иммунитета в динамике после радионуклидного лечения для оптимизации протоколов РЙТ при болезни Грейвса современными таргетными препаратами [116, 188, 263].

В литературе имеются сообщения, что радионуклидная терапия при болезни Грейвса обладает специфическими иммунными эффектами, а реактивация аутоиммунного процесса в первый месяц после лечения ^{131}I является результатом потери регуляции рТТГ-реактивных клеток Treg [43, 124, 186]. В эксперименте обнаружено, что при истощении Treg анти-CD25 у трансгенных мышей, экспрессирующих субъединицу А рТТГ человека, последующая иммунизация антигеном рТТГ индуцировала обширную лимфоцитарную инфильтрацию щитовидной железы и гипотиреоз [217]. Более того, был получен положительный титр аутоантител против ТПО и ТГ, аналогично описанным ранее результатам у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидной терапии.

В другом исследовании было показано как снижение, так и увеличение количества Treg и NK-клеток в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса, а также подавление супрессорной функции Treg после радионуклидной терапии [186]. Treg пациентов с болезнью Грейвса продуцировали меньше IL-10 после терапии ^{131}I , что указывает на сохраненный дефект регуляторной функции данной клеточной популяции. В этом же исследовании, в условиях *in vitro*, было продемонстрировано, что предварительная обработка метимазолом супернатантов культур клеток крови пациентов с болезнью Грейвса смягчает иммунные изменения, вызванные радионуклидной терапией: меньшее изменение количества Treg, тенденция к менее выраженной нарушенной супрессорной функции Treg и восстановление нормальных уровней противовоспалительных цитокинов.

С другой стороны, снижение уровня IL-10 подтвердило бы повышенную провоспалительную среду, о которой сообщалось ранее у пациентов с болезнью Грейвса после РЙТ [261]. Как показывают предыдущие исследования *in vitro*, супрессорная способность Treg, по-видимому, не зависит от высвобождения растворимых рецепторов цитокинов [180]. Многие авторы согласуются с мнением о том, что радионуклидная терапия при гипертиреозе Грейвса приводит к выраженной секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов [82, 119, 193].

Имеются противоположные сообщения о снижении уровня хемокина CXCL10 в сыворотке крови после терапии ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса, но

не у пациентов с многоузловым токсическим зобом [89]. Индуцированные ^{131}I изменения циркулирующих уровней цитокинов/хемокинов могут определять повышенную активность эффекторных клеток, более высокую выработку антител к рТТГ, а также усугублять дефект Treg [120, 121, 244]. Имеются данные о том, что у пациентов с рецидивом болезни Грейвса значительно повышены уровни растворимой формы лиганда CD40 (sCD40L) и β -хемокина CCL5 (RANTES) до радионуклидного лечения остаются выше контрольных значений и после терапии ^{131}I независимо от степени тяжести тиреотоксикоза [12]. Авторы подчеркивают, что на 14-е сутки после РЙТ отмечается нормализация содержания IL-2, IL-10, IL-12 и TNF- α , но сохраняются повышенными концентрации IL-4, IL-6, IL-8. Однако, в свете современных этиотропных подходов к лечению заболевания считается, что состояние аутоиммунитета в динамике после радионуклидного лечения болезни Грейвса должно оцениваться во временных интервалах, сопряженных с ожидаемым развитием гипотиреоидного состояния, а не после достижения максимальной поглощенной дозы в щитовидной железе, которая формируется через две недели после приема фиксированной активности ^{131}I [72, 98, 191].

Известно, что радионуклидное лечение основано на воздействии излучения изотопа ^{131}I на клетки-мишени щитовидной железы, приводящем к повреждению ДНК, как напрямую, через разрыв молекулярных связей, так и косвенно через образование свободных радикалов [272]. В частности, облучение вызывает широкий спектр клеточных повреждений из-за образования АФК и перекисного окисления липидов плазматической мембраны [155, 156]. Клеточная гибель, связанная с РЙТ, происходит как через апоптоз, так и через некроз [327]. При оценке генетического повреждения и уровня радиогенного окислительного стресса после однократного приема терапевтической дозы ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса, наблюдаемых в течение 180 дней после лечения, было показано, что резкое увеличение микроядер в периферических лимфоцитах пациентов коррелирует с высвобождением кластогенного фактора в плазме, измеренного путем индукции микроядер *in vitro* в периферических лимфоцитах здорового донора [249].

Авторы делают вывод о том, что индукция микроядер была прямым следствием не только энергетической модификации ^{131}I на генетическом материале, но и окислительного стресса. В этой связи заслуживает внимание исследование уровня окислительного стресса в динамике лечения ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса с развитием эутиреоза через месяц после радионуклидного лечения [314]. Было отмечено повышение активности каталазы (CAT) и глутатионпероксидазы (GPX) в эритроцитах, а также наблюдался более высокий уровень антиоксидантного статуса (TAS) в сравнении с показателями до приема ^{131}I , хотя активность супероксиддисмутазы (CuZn-SOD) и GPX была выше, чем в контрольной группе. Более того, у пациентов с гипертиреозом до лечения ^{131}I выявлена положительная корреляция между уровнем ТТГ и TAS, тогда как после радионуклидной терапии уровень ТТГ положительно коррелировал с активностью CuZn-SOD, CAT и GPX. Однако, не установлено статистически значимой корреляции между количеством введенной дозы ^{131}I и значениями оцененных параметров окислительного стресса. К настоящему времени, очевидно, что предпочтительная цель радионуклидной терапии в лечении болезни Грейвса состоит в том, чтобы вызвать постоянный гипотиреоз [14, 372, 373]. Однако только до 30% пациентов с пострadiационным гипотиреозом имеют отрицательный титр антител к рТТГ, ТПО и другим антигенам щитовидной железы [133, 136, 363].

Долгое время считалось, что оперативное и радионуклидное лечение являются радикальными методами болезни Грейвса, так как устраняют главную интра-тиреоидную антигенную детерминанту заболевания – рТТГ, и вызывают развитие стойкого гипотиреоза [112, 244, 364]. Однако, к настоящему времени, все большее число исследователей подчеркивают, что гипотиреоз, вследствие тиреоидэктомии или радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса приводит к необходимости пожизненной заместительной терапии гормонами щитовидной железы и соответствующему клиническому и гормональному мониторингу, а также не влияет на нарушенную регуляторную функцию Treg, дефект которых лежит в основе иммунологической толерантности при гипертиреозе Грейвса [279, 280, 347].

По современным представлениям радионуклидное лечение, как и тиреоидэктомия уменьшают массу функционирующей тиреоидной паренхимы, но не изменяют механизм, лежащий в основе развития болезни Грейвса за исключением удаления интратиреоидных лимфоцитов как источника продукции антител к рТТГ [37, 85, 363]. В свете современных тенденций к разработке этиотропных подходов к лечению болезни Грейвса некоторые авторы подчеркивают, что истинная иммунологическая ремиссия заболевания помимо стойкого снижения антител к рТТГ предполагает наличие эутиреоидного состояния, поддерживаемого в течение года, без необходимости приема левотироксина или антитиреоидных препаратов [363, 371, 372].

Считается, что антигенспецифическая иммунотерапия при болезни Грейвса должна быть направлена на восстановление иммунологической толерантности к иммунным доминантным эпитопам, участвующим в аутоиммунном процессе, без индукции общей иммуносупрессии [6]. Кроме того, гипертиреоз Грейвса, в отличие от многих других аутоиммунных заболеваний, имеет специфический аутоантиген, который является внеклеточным доменом рТТГ [39]. Первоначальные подходы к разработке иммунотропных подходов к лечению болезней Грейвса базировались на том, что рТТГ является идеальным терапевтическим кандидатом для целенаправленной иммуномодуляции заболевания [5]. Современные терапевтические варианты лечения гипертиреоза Грейвса, включают те, которые непосредственно нацелены на В-клетки или связанные с ними взаимодействия и цитокины, или, альтернативно, специфическую модуляцию рТТГ с использованием антагонистов малых молекул, антагонистических моноклональных антител рТТГ или «толерогенных» пептидов рТТГ [116]. Проспективное исследование с включением 20 пациентов с болезнью Грейвса, сравнивающее краткосрочное лечение с использованием метимазола с ритуксимабом (RTX) или без него продемонстрировало некоторую эффективность с устойчивой ремиссией в группе RTX после 23 месяцев наблюдения, но лечение с RTX оказалось наиболее эффективными у пациентов с низким уровнем антител к рТТГ (<5 МЕ/л) [237]. Похожие результаты были получены в исследовании с участием 13 пациентов с рецидивом болезни Грейвса, в котором было пока-

зано, что 70% пациентов с болезнью Грейвса после лечения RTX оставались эутиреоидными при продолжительности наблюдения 18 месяцев [188]. У пациентов, которые ответили на терапию, были низкие уровни антител к рТТГ до лечения (медиана 4 МЕ/л) и менее выраженный гипертиреоз. Более того, имеются данные, что терапия RTX более значительно, чем при приеме антитиреоидных препаратов способствует снижению содержания в сыворотке крови антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса, но снижение никак не коррелирует со степенью В-клеточного истощения [238]. Таким образом, сохранение остаточных аутореактивных В-клеток памяти наряду с плазматическими клетками, которые могут продолжать продуцировать антитела к рТТГ являются основной причиной отсутствия окончательного успеха в лечении RTX болезни Грейвса.

К настоящему времени, возрастающая потребность в разработке иммунотропных схем лечения привела к появлению нескольких новых терапевтических инструментов для таргетной терапии заболевания, включая толерогенные пептиды, малые молекулы антагонисты рТТГ, иммуномодуляторы В-лимфоцитов и рТТГ, моноклональные антитела IgG1, а также ингибиторы рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 типа [185, 264, 271]. Большинство из этих биологических агентов остаются в стадии изучения II фазы клинических, либо в доклинических исследованиях, с включением преимущественно пациентов с болезнью Грейвса и эндокринной офтальмопатией, что значительно затрудняет разработку персонализированного иммунотропного подхода в лечении пациентов без эндокринной офтальмопатии ввиду существующих различий в реализации регуляторного дефекта и иммунореактивности против рТТГ при сочетании данных заболеваний [37, 265, 347].

Новые терапевтические подходы не лишены и потенциальных ограничений [80, 144, 160]. Помимо риска ослабления иммунитета при использовании не связанных с рТТГ генно-инженерных биологических препаратов, остается неясным, уменьшат ли они долгосрочный риск гипотиреоза и объем щитовидной железы в случае тиреомегалии и действительно ли предотвратят отдаленный рецидив гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса [176, 183, 188].

Начальные этапы апробации новых биологических молекул для иммунотропной терапии болезни Грейвса привели к необходимости идентификации патологических доминантных эпитопов Т- и В-клеток у пациентов с гипертиреозом Грейвса, без эндокринной офтальмопатии, после радикальных методов лечения для идентификации специфичных иммунотропных мишеней, преимущество которых заключается в применении целенаправленного подхода для предотвращения нарушения функционирования иммунной системы и восстановления эутиреоза без необходимости пожизненной заместительной терапии левотироксином [238, 359, 360].

В настоящее время актуальными представляются исследования состояния регуляторного дефекта Treg в отношении Th-клеток и отдельных субпопуляций В-лимфоцитов после радионуклидного лечения заболевания [37, 116, 370]. В то же время, остается неизученным состояние дефекта Treg, и связанные с ним отдельные субпопуляции Т- и В-клеток у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии и устранения органа-мишени, и, соответственно, снижении антигенной нагрузки на иммунную систему больных. [51, 85, 118]. В связи с этим необходимы дополнительные исследования, определяющие состояние дисфункции Treg и клеточно-опосредованного иммунитета в динамике после оперативного и радионуклидного лечения и раскрывающие механизмы воздействия ^{131}I на дефект иммунорегуляции у пациентов с болезнью Грейвса.

Таким образом, ограниченность наших знаний в функционировании метаболических каналов и свободно-радикального окисления клеток иммунной системы, которые могут потенцировать цитотоксичность, как самих иммуноцитов, так и тиреоцитов, тем самым усиливая свою сигнализацию при развитии и поддержании аутоиммунной реакции при болезни Грейвса, предопределяет необходимость поиска новых маркеров и вектора для разработки этиотропных терапевтических подходов к лечению заболевания.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика пациентов и дизайн исследования

Исследование проводилось с 2016 по 2021 гг. на базе кафедры госпитальной терапии и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – д.м.н., профессор А. В. Протопопов), эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (главный врач – Е. Е. Корчагин). Клинико-иммунологические исследования выполнены в лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Научно-исследовательского Института медицинских проблем Севера – обособленного подразделения федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (директор – д.м.н., профессор Э. В. Каспаров).

В одноцентровое, проспективное, когортное, открытое, контролируемое исследование включено 180 женщин с лабораторно подтвержденной болезнью Грейвса, средний возраст $43,09 \pm 12,81$ лет, от 18 до 65 лет. Все пациенты наблюдались в Клинике эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» с дебюта заболевания. Группу контроля составили 85 здоровых женщин, аналогичного возраста, с отсутствием отягощенного анамнеза по заболеваниям щитовидной железы, а также аутоиммунным заболеваниям у себя и кровных родственников, отсутствием структурных изменений по данным ультразвукового исследования (УЗИ) щитовидной железы на момент включения в исследование.

Критерии включения в исследование: женский пол, возраст от 18 до 65 лет, лабораторно подтвержденная болезнь Грейвса.

Критерии невключения: узловой/многоузловой токсический зоб, беременность и период лактации, эндокринная офтальмопатия, рецидив гипертиреоза после лечения болезни Грейвса радиоактивным йодом, наличие инфекционных и аллергических заболеваний, новообразования, системные заболевания соединительной

ткани, другие заболевания органов эндокринной системы, ранее подтвержденная сердечная недостаточность, острые респираторные и вирусные инфекции, прием глюкокортикостероидов или иммуносупрессивных препаратов, а также введение профилактических прививок в течение 3-х месяцев, предшествующих иммунологическому и гормональному анализу.

Критерии исключения из исследования: отказ пациента или его законных представителей от дальнейшего участия в исследовании, несоблюдение пациентом назначенной схемы консервативного лечения тиамазолом, появление любых критериев, соответствующих критериям невключения.

Диагноз болезни Грейвса верифицирован согласно Национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению тиреотоксикоза с диффузным зобом (болезнь Грейвса) и соответствующим клиническим, лабораторным, и инструментальным критериям, а также степени тяжести тиреотоксикоза [14]. Все пациенты были классифицированы по степени выраженности клинических проявлений и гормональных нарушений, соответствующих субклиническому, манифестному или осложненному тиреотоксикозу, а также уровню повышения антител к рТТГ. Концентрация антител к рТТГ рассматривалась в аспекте взаимосвязи со степенью компенсации гипертиреоза и изменений иммунологических показателей, отражающих персистенцию или индукцию ремиссии аутоиммунного процесса в динамике, а также в исходе различных методов лечения болезни Грейвса.

Рецидивом гипертиреоза считалось изменение показателей тиреоидного статуса, соответствующих критериям субклинического или манифестного гипертиреоза у обследуемых пациентов с ранее достигнутым и подтвержденным лабораторно медикаментозным эутиреозом [372]. Ремиссией болезни Грейвса определялось эутиреоидное состояние, достигнутое на фоне консервативной терапии и поддерживаемое в течение года после отмены тиамазола [373].

На момент включения в исследование у всех обследуемых проводился сбор жалоб и анамнеза заболевания. Изучение клинико-анамнестических данных обследуемых пациентов с впервые выявленным заболеванием проводилось с использованием медицинской документации (амбулаторные карты, форма № 025/у-04; ис-

тории болезней стационарного больного, форма № 003/у). Оценивали хронологию развития заболевания, с уточнением времени от момента появления первых симптомов тиреотоксикоза до верификации диагноза болезни Грейвса.

Всем пациентам после верификации диагноза болезни Грейвса была инициирована консервативная терапия по стандартному протоколу до достижения медикаментозного эутиреоза, с постепенным переходом на поддерживающую дозу тиреостатика [14]. При консервативной терапии у всех пациентов использовался препарат из группы антитиреоидных препаратов – тиамазол (регистрация № UA/8848/01/01 от 12.07.2013, приказ № 593 от 12.07.2013; H03BB02) в начальных дозах от 20 до 40 мг в сутки до достижения эутиреоза перед оперативным или радионуклидным лечением, а также, у отдельных пациентов, в качестве базового длительного (12 – 24 месяца) курса лечения и β – адреноблокатор – пропранолол 80-120 мг/сутки, в зависимости от степени тяжести тиреотоксикоза. В случае развития рецидива гипертиреоза на фоне поддерживающей дозы тиамазола, доза тиреостатика увеличивалась до лечебной. После достижения медикаментозного эутиреоза пациенты с рецидивом заболевания распределялись на радикальные методы лечения согласно критериям, установленным национальными клиническими рекомендациями по ведению пациентов с болезнью Грейвса.

В основу формирования подгрупп пациентов с болезнью Грейвса при оценке клинико-иммунологических показателей при консервативной терапии тиамазолом была заложена концепция иммуномодулирующего эффекта тиреостатика при условии стойкого медикаментозного эутиреоза, индуцированного непрерывным приемом тиамазола.

Оценка клинико-гормональных и иммунологических показателей у пациентов с болезнью Грейвса осуществлялась в дебюте заболевания, до начала консервативной терапии тиамазолом, на фоне медикаментозного эутиреоза, и далее в динамике, до и через 1,3 и 6 месяцев после оперативного и радионуклидного лечения.

Дизайн исследования и стратификация лечебной тактики клинических групп представлены на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования и стратификация лечебной тактики клинических групп

Показаниями к оперативному лечению являлись: большой объем щитовидной железы (более 40 мл), планирование беременности в ближайшие 12 месяцев, рецидив тиреотоксикоза после курса консервативной терапии тиамазолом, наличие противопоказаний для радионуклидного лечения, а также в случае отказа пациента от лечения радиоактивным йодом. Оперативное лечение всех включенных в исследование пациентов проводилось на базе II-го хирургического отделения КГБУЗ «Краевая клиническая больница», где оказывается специализированная медицинская помощь пациентам с заболеваниями щитовидной железы, оператор - хирург-эндокринолог высшей категории В. А. Маньковский. После достижения медикаментозного эутиреоза всем пациентам с болезнью Грейвса из группы оперативного лечения проводилась операция в объеме эпифасциальная тиреоидэктомия. Часть удаленной щитовидной железы погружалась в пластиковый контейнер с изотоническим раствором натрия хлорида для последующей гомогенизации, выделения из ткани лимфоцитов и подготовки к иммунологическому исследованию.

Радионуклидное лечение проводилось на базе отделения радионуклидной терапии центра ядерной медицины ФГБУ «Федеральный Сибирский Научно-клинический Центр» ФМБА России, г. Красноярск (директор – Н. Г. Чанчикова).

Поддерживающая доза тиамазола отменялась за 14 дней до приема раствора ^{131}I . Клинико-гормональное и иммунологическое обследование пациентов с болезнью Грейвса, направленных на РЙТ, проводилось до приема терапевтической активности ^{131}I , а также через 1, 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения.

Клинико-иммунологическое обследование пациентов с болезнью Грейвса до РЙТ проводилось непосредственно в день проведения процедуры, соответственно, через 2 недели после отмены тиамазола. В зависимости от объема щитовидной железы пациентам назначалась фиксированная удельная терапевтическая активность в диапазоне от 400 до 700 МБк перорально в виде изотонического водного раствора натрия йодида (NaI-131).

Для проведения радионуклидного лечения пациента вызывали в специализированное свинцованное помещение, где он принимал per os водный раствор NaI-131 назначенной активности. После этого пациент переводился на «закрытый» ре-

жим пребывания в стационаре пока не достигал безопасных для окружающих показателей радиоактивного излучения. Выведение пациентов из «закрытого» режима осуществляли при снижении мощности излучения от тела менее 20 мкЗв/час на расстоянии 1 метра, согласно Нормам Радиационной Безопасности от 99/2009 (НРБ-99/2009). Критерием эффективности радионуклидного лечения являлось развитие гипотиреоза, требующего назначения заместительной терапии препаратами левотироксина натрия в течение 6 месяцев после проведенного лечения.

2.2. Клинические, лабораторные, инструментальные методы исследования и верификация диагноза

Отбор больных осуществлялся методом сплошной выборки при обследовании на базе эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск. При объективном осмотре оценивались клинические признаки тиреотоксикоза и его осложнений, глазные симптомы, общеклинические, гормональные и иммунологические показатели. У всех пациентов измерялись антропометрические показатели: рост (см), масса тела (кг), а также уровень артериального давления, частота сердечных сокращений, наличие дефицита пульса. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле: $\text{ИМТ} = \text{масса тела} / \text{рост}^2 \text{ (кг/м}^2\text{)}$.

Степень увеличения щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса и в группе контроля оценивали методом пальпации в соответствии с классификацией ВОЗ (2001) – при отсутствии видимого увеличения при глотании и пальпаторном увеличении размера долей щитовидной железы более дистальной фаланги большого пальца обследуемого диагностировался зоб I степени, если щитовидная железа была видна при глотании и наблюдалось ее увеличение более дистальной фаланги большого пальца обследуемого при пальпации диагностировался зоб II степени. Определение гормонов в сыворотке крови проводилось в гормональной лаборатории КГБУЗ «Краевая клиническая больница».

Забор крови из локтевой вены обследуемых проводился между 8 и 9 часами утра натощак, после предварительного голодания в течение не менее 8 часов и не более 12 часов. Уровень ТТГ и свТ4 в сыворотке крови определялся методом хими-

люминесцентного иммуноанализа на микрочастицах на автоматическом анализаторе ARCHITECTi1000sr (Abbott, США), указанный референсный диапазон, соответственно, 0,4 - 4,0 мЕд/л и 9,01 - 19,05 пмоль/л. Определение свТЗ в сыворотке крови осуществлялось методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ДС-ИФА-ТИРОИД-ТЗсвободный» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия), референсный интервал (2,14 - 6,42 пмоль/л). Уровень антител к рТТГ оценивался методом ИФА при помощи стандартного набора «Medizym T.R.A.» (MedipanGMBH, Германия), рекомендованная точка разделения (cut-off) - 1,5 мЕд/л («серая» зона 1-1,5 мЕд/л). Уровень антител ТПО оценивался методом ИФА при помощи соответствующего набора «АТ-ТПОХема-Медика», (Россия), референсный интервал < 35 мЕд/л.

Содержание в сыворотке крови ТТГ, свТЗ, свТ4, антител к рТТГ оценивался исходно и в динамике консервативной терапии тиамазолом, а также через 1, 3 и 6 месяцев после оперативного, и радионуклидного лечения. Развёрнутый анализ крови с подсчётом процентного содержания пяти типов лейкоцитов, а также биохимический анализ крови с определением щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, билирубина и его фракций проводился исходно, перед инициацией консервативной терапии тиамазолом и далее - в динамике консервативного лечения, по показаниям, в случае появления желтухи, легкой простуды, жидкого стула, темной мочи, лихорадки, фарингита или цистита.

Инструментальное исследование структуры, размеров и объема щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса, и у контрольной группы проводилось ультразвуковым методом на аппарате «Philips iU22 xMatrix» (США) с линейным датчиком 7,5 МГц.

При оценке структуры щитовидной железы описывались: гомогенность эхо-структуры ее долей и перешейка, наличие фокальных изменений и узловых образований, кровотока, рассчитывался объем ткани.

Объем щитовидной железы рассчитывался по формуле J. Brunn: $[(W \cdot D \cdot L)_{\text{прав}} + (W \cdot D \cdot L)_{\text{лев}}] \cdot 0,479$, где W, D, L - ширина, толщина и длина (мм) правой и левой долей щитовидной железы; 0,479 - коэффициент эллипсоидности.

Согласно Национальным клиническим рекомендациям 2021 г., за нормальный у женщин принимали объем щитовидной железы не превышающий 18 см³. Диффузным зобом обозначалось диффузное увеличение щитовидной железы без узловых образований; узловым - узловые образования без увеличения объема щитовидной железы, многоузловым зобом - несколько узловых образований в щитовидной железе. При обнаружении узловых или многоузловых образований в щитовидной железе обследуемые из исследования исключались. Пациентам с подозрением на загрудинное расположение зоба проводилось рентгенологическое исследование грудной клетки с контрастированием пищевода барием и мультиспиральная компьютерная томография органов шеи и грудной полости.

2.3. Иммунологические методы исследования

Иммунологические исследования проводились на базе лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера» (заведующий лабораторией, доктор медицинских наук, профессор А. А. Савченко).

Венозную кровь из локтевой вены забирали в пробирки с гепарином между 8 и 9 часами утра натощак, после предварительного голодания в течение не менее 8 часов и не более 12 часов.

Лимфоциты из ткани щитовидной железы получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США) ($\rho=1,077$) клеточной суспензии, полученной путем мягкого механического выдавливания клеток из фрагментированной паренхимы щитовидной железы [17]. Клетки трижды отмывали в растворе Хенкса.

2.3.1. Исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы

Исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы проводилось методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции, соответственно, цельной периферической крови и лимфоцитов, выделенных из ткани щитовидной железы, с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7 [11].

Распределение антител по каналам флуоресценции проводилось в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [15]. Пробоподготовка осуществлялась по стандартной методике [209]. Лизис эритроцитов проводился по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США).

Субпопуляционный состав Treg, Th-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови изучался по экспрессии на их поверхности рецепторов CD45R0 и CD62L. Исследовался состав следующих клеточных субпопуляций: наивные ($CD45R0^-CD62L^+$), центральной памяти ($CD45R0^+CD62L^+$), эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) и терминально-дифференцированные ($CD45R0^-CD62L^-$). Уровень экспрессии поверхностного рецептора CD23 на отдельных субпопуляциях В-клеток оценивали в относительных единицах (о.е.) по средней интенсивности флуоресценции (MFI).

Отмытые лимфоциты инкубировали с тестируемым моноклональным антителом 45 минут при $t = +4^\circ\text{C}$. Дважды отмывали в 199 среде и затем инкубировали с FITC- мечеными антителами 30 минут при $t = +4^\circ\text{C}$.

После того как клетки отмыли, они готовы для наблюдения. Окрашенные клетки просматриваются с помощью флуоресцентного микроскопа под водной иммерсией.

Количество антиген позитивных клеток определялось, как процент флуоресцирующих клеток, при просматривании 100 лимфоцитов за вычетом процента флуоресцирующих клеток, наблюдаемых в препарате отрицательного контроля.

В качестве отрицательного контроля используют препараты, подготовленные аналогичным образом, за исключением того, что вместо моноклональных антител клетки обрабатывают 199 средой.

Анализ окрашенных клеток проводился на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Обработка полученных цитофлуориметрических результатов осуществлялась с помощью программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, США) [174]. В каждой пробе анализировалось не менее 50000 лимфоцитов.

2.3.2. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови

Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. В реакции были использованы наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Используемый твердофазный метод иммуноанализа основан на принципе «сэндвича».

Анализ проводится в две стадии. На первой стадии используют калибровочные пробы с известной концентрацией Ig (А, М, G) и исследуемые образцы инкубируются в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (МКАТ) к Ig (А, М, G). Затем планшет отмывается.

На второй стадии связавшийся в лунках Ig (А, М, G) обрабатывают конъюгатом МКАТ к Ig (А, М, G) с пероксидазой (конъюгат МКАТ и иммобилизованные в лунках планшета МКАТ специфичны к разным участкам молекулы Ig (А, М, G). После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «им-

мобилизованные МКАТ – Ig (A, M, G) - конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (ортофенилендиамина).

Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрации Ig (A, M, G) в анализируемом образце. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитываются фотометрически. Концентрацию Ig (A, M, G) в пробах определяют по калибровочному графику. Состояние гуморального иммунитета характеризовали также уровнем относительного синтеза IgA (IgA/CD19⁺), IgM (Ig M/CD19⁺) и IgG (IgG/CD19⁺) [11].

2.3.3. Определение уровня продукции АФК в нейтрофилах периферической крови методом хемилюминесценции

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения лимфоцитов, $\rho=1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофилов. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Красноярск) [24].

Реактивность нейтрофилов периферической крови охарактеризована следующими показателями: время выхода на максимум (T_{\max} – скорость развития хемилюминесцентной реакции), максимальное значение интенсивности (I_{\max} – максимальный уровень синтеза АФК) и площадь под кривой хемилюминесценции (S – суммарный синтез АФК за 90 минут измерения).

В качестве индикаторов хемилюминесцентной реакции использовались люцигенин (реакция светоизлучения только при взаимодействии с супероксид-радикалом) и люминол (реакция светоизлучения при взаимодействии со всеми АФК).

2.3.4. Билюминесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проводилось по ранее разработанным методикам [25]. Для этого суспензию выделенных нейтрофилов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии разрушенных нейтрофилов.

Определялась активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (НАДФ-МДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ и НАДФ-ИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР).

В инкубационную смесь для определения активности НАД(Ф)-ИЦДГ и НАД-ИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней обр. НАД-ГДГ и обр. НАД(Ф)-ГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – этилендиаминтетрауксусная кислота в концентрации 0,5 мМ. После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)^+) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавинмононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н: ФМН оксидоредуктаза-люцифераза из

Photobacterium leiognatli (полученном в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск [25]. Все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере с pH 7,0. После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы производили измерение свечения.

Измерение активности ферментов осуществляли на 36-канальном биохемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Россия). Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, нами определялись показатели, условно названные «субстратный фон ферментов». Определение производили в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получаются относительные значения активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности необходимо построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н.

Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне $10^{-9} - 10^{-4}$ М вносили в кюветы биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях, указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном pH буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также pH-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы [22], калибровочные графики строились для каждого pH буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta[C] \times V \times 10^6}{T}$$

где $\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах «фермент» и «фон фермента»;

V – объем пробы в миллилитрах; T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е = 1 мкмоль/минуту.

2.4. Статистические методы исследования

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Проверка количественных данных на нормальность проводилась с помощью теста Шапиро-Уилкса (Shapiro-Wilks W-test). Описание выборки производилось с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q_1-Q_3), а также в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений от среднего ($M \pm SD$) в случае нормального распределения показателей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивалось по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Сопоставление значения признака на разных этапах динамического наблюдения проводилось с использованием непараметрического рангового дисперсионного анализа по Фридмену (Friedman ANOVA by Ranks). При сравнении двух зависимых групп использовался критерий Вилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test). При изучении взаимосвязей между признаками использовался корреляционный анализ методом ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для оценки диагностической ценности моделей прогноза эффективности консервативного, оперативного и радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса использовался ROC-анализ с помощью программы GraphPad Prism version 8.4.3. (GraphPad Software Inc., 2020). Количественной характеристикой ROC-анализа являлась площадь под кривой (AUC). Информативная ценность прогностической модели возрастала по мере приближения AUC к 1,0. Для диагностически ценных показателей определялось оптимальное значение, чувствительность и специфичность в отношении альтернативных прогнозов.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ, ГОРМОНАЛЬНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ДЕБЮТЕ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

3.1. Клинико-гормональная характеристика пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

Болезнь Грейвса является одной из форм тиреотоксикоза, обусловленного гиперфункцией щитовидной железы. Известно, что болезнь Грейвса сопровождается продукцией органоспецифических аутоантител, инфильтрацией железы различными субпопуляциями лимфоцитов и продукцией ими широкого спектра цитокинов, в частности, TNF- α , IL-2, IL-4 [1, 7, 355]. Антитела к рТТГ имеют прямое и основное патогенетическое значение при болезни Грейвса [2, 5, 79]. Однако в клинической практике при данном заболевании наблюдается гетерогенность аутоантител, вследствие чего наряду с усиленным синтезом TSAb, являющихся основной причиной манифестации заболевания, в сыворотке пациентов с болезнью Грейвса в большинстве случаев выявляются и циркулирующие антитела к ТПО [291].

Считается, что именно антитела к ТПО оказывают наиболее выраженное цитотоксическое действие на тиреоциты в дебюте болезни Грейвса [187]. Они фиксируют на своих специфических участках связывания компонента и тем самым определяют антителозависимую и комплемент-опосредованную цитотоксичность [240, 241].

В ходе инициированного исследования были получены данные, характеризующие клинико-иммунологические особенности течения заболевания у пациентов с болезнью Грейвса в условиях впервые развившегося гипертиреоза. Обследование пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса проводили в дебюте болезни Грейвса, в фазу гипертиреоза, до начала консервативной терапии тиамазолом.

В проспективное исследование включено 180 женщин с впервые выявленной болезнью Грейвса, средний возраст $43,21 \pm 12,75$ лет. При верификации болезни

Грейвса манифестный гипертиреоз диагностирован у 135 (75,00 %) и субклинический гипертиреоз – у 45 (25,00 %) пациентов, соответственно, ТТГ = 0,010 мЕд/л (0,001 – 0,020), свТ3 = 7,22 пмоль/л (6,12 – 10, 11), свТ4 = 30,02 пмоль/л (23,52 – 37,91) и ТТГ = 0,011 мЕд/л (0,004 – 0,112), свТ3 = 4,34 пмоль/л (3,39 – 5, 41), свТ4 = 14,37 пмоль/л (11,39 – 17,41). Медиана уровня антител к рТТГ у обследованных пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не отличалась в зависимости от степени тяжести гипертиреоза на момент манифестации заболевания и составила 12,52 мЕд/л (5,95 – 21,03). Данные анамнеза показали, что у 75 (41,00 %) обследуемых женщин с болезнью Грейвса один из кровных родственников женского пола по материнской линии имеет аутоиммунную тиреопатию.

Особенности клинической картины у пациентов с болезнью Грейвса, в зависимости от степени тяжести синдрома тиреотоксикоза в дебюте заболевания, представлены в таблице 1.

При анализе структуры клинических проявление и жалоб пациентов с дебютом болезни Грейвса было установлено, что независимо от степени тяжести тиреотоксикоза, наиболее часто поражается сердечно-сосудистая система. Синусовая тахикардия была зафиксирована практически у всех пациентов, как с манифестным, так и с субклиническим тиреотоксикозом. Медианы частоты сердечных сокращений и показателей артериального давления составили, соответственно, 98 уд./мин. (87; 134) и 135/85 мм. рт. ст. (120/70; 140/90).

Обращает на себя внимание диагностируемая независимо от степени тяжести тиреотоксикоза в незначительном проценте случаев фибрилляция предсердий. При этом, у 9 (6,00%) пациентов с манифестным тиреотоксикозом был зафиксирован тахисистолический вариант фибрилляции предсердий.

Астенический синдром был наиболее выражен у пациентов с манифестным тиреотоксикозом, в среднем, снижение массы тела отмечалось на $6,78 \pm 4,81$ кг за 2-3 месяца от момента появления первых симптомов заболевания, медиана ИМТ составила 24,31 кг/кв м (21,65, 28,19). Нарушение менструального цикла у обследуемых пациентов отмечалось независимо от степени тяжести тиреотоксикоза и происходило по типу олигоменореи – у 16 (69,00 %) и аменореи – у 7 (30,00 %).

Таблица 1 – Клинические проявления болезни Грейвса в дебюте заболевания и частота их встречаемости

Клинические проявления 1	Частота встречаемости, абс. (%)	
	Субклинический тиреотоксикоз (n = 45) 2	Манифестный тиреотоксикоз (n = 135) 3
Сердцебиение	42 (93,00 %)	78 (58,00 %)
Потливость	39 (86,00 %)	72 (53,00 %)
Дрожь в теле	28 (62,00 %)	57 (42,00 %)
Чувство жара	23 (51,00 %)	45 (33,00 %)
Нарушение сна	21 (46,00 %)	34 (25,00 %)
Одышка	20 (44,00 %)	67 (49,00 %)
Диарея	19 (42,00 %)	32 (24,00 %)
Раздражительность	19 (42,00%)	34 (25,00 %)
Плаксивость	18 (40,00 %)	32 (24,00 %)
Мышечная слабость	16 (35,00 %)	36 (26,00 %)
Лимфаденопатия	15 (42,00 %)	21 (15,00 %)
Жажда	14 (31,00 %)	20 (15,00 %)
Фибрилляция предсердий	12 (26,00 %)	19 (14,00 %)
Похудание	11 (24,00 %)	69 (51,00 %)
Крапивница	9 (20,00 %)	15 (11,00 %)
Субфебрильная температура	9 (20,00 %)	12 (9,00 %)
Нарушение менструального цикла	7 (15,00 %)	16 (12,00 %)

Нервно-мышечные изменения у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса наблюдались только при манифестном тиреотоксикозе и определялись положительными симптомами Мари, и телеграфного столба в 59 (44,00 %) и 41 (30,00 %) случаях, соответственно.

При объективном осмотре у большинства пациентов с манифестным и у четверти пациентов с субклиническим тиреотоксикозом обращала на себя внимание повышенная влажность кожных покровов. При осмотре передней области шеи у 121 (67,00%) пациента щитовидная железа была видна при глотании и соответствовала второй степени увеличения по ВОЗ при пальпации. У незначительной доли пациентов пальпация регионарных лимфатических узлов позволила диагностировать неспецифическую лимфаденопатию независимо от степени тяжести тиреотоксикоза. В основном определялись эластичной консистенции, безболезненные, подвижные, размером до 0,5-1,0 см в диаметре поверхностные лимфатические узлы латеральной области шеи.

При оценке ультразвуковых характеристик тиреоидной паренхимы, как у пациентов с манифестным, так и с субклиническим гипертиреозом визуализировалась диффузно неоднородная структура щитовидной железы с участками повышенной и пониженной эхогенности и усиленным кровотоком при ЦДК, медиана объема железы составила 29,31 мл (19,61 – 46,21). Установлено, что объем щитовидной железы у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания не зависит от степени тяжести тиреотоксикоза. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса с объемом щитовидной железы более 40 мл установлен статистически значимо более высокий титр антител к ТПО, чем у женщин с болезнью Грейвса с объемом железы от 18 до 40 мл и менее 18 мл (рисунок 2).

Выявленная связь гипертрофии тиреоидной паренхимы с уровнем антител к ТПО, отражающим цитотоксическую активность иммунной системы, подтверждается корреляцией между степенью лимфоидной инфильтрации железы при болезни Грейвса и экспрессией маркера пролиферации Ki-67 на тиреоцитах: чем больше выражена очаговая лимфоидная инфильтрация, тем большими оказываются рост и

пролиферация тиреоцитов, которые обусловлены прямым их контактом с мононуклеарными лейкоцитами [324].

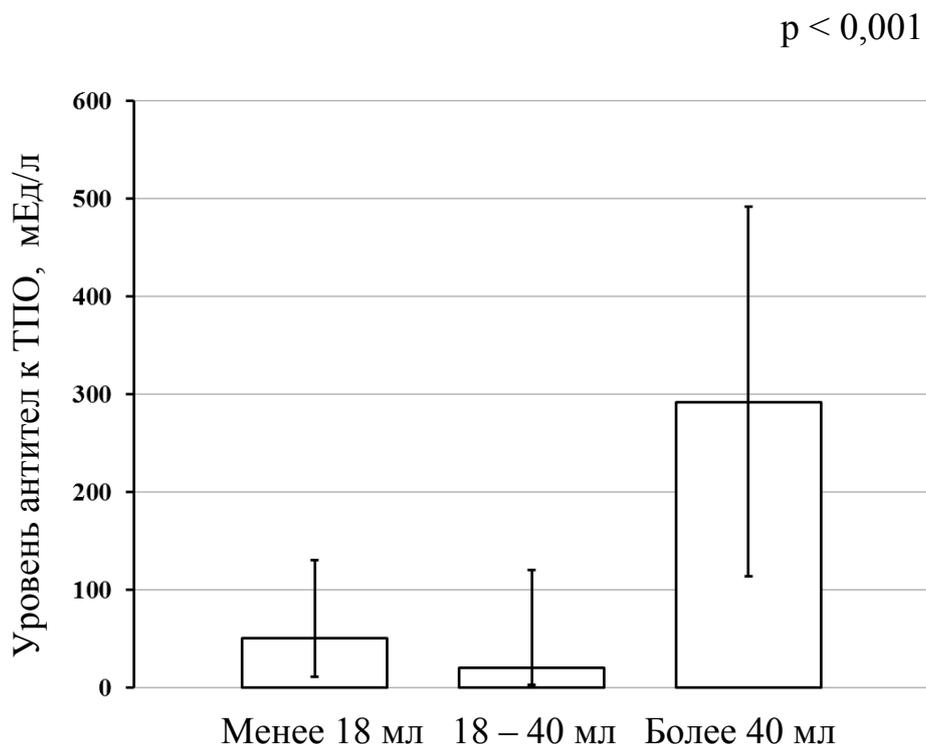


Рисунок 2 – Содержание антител к ТПО у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от объема щитовидной железы

При изучении клинико-гормональных и иммунологических параметров было установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с различным уровнем антител к ТПО в дебюте заболевания имеются особенности исследуемых показателей. В связи с этим, принцип формирования клинических групп пациентов основывался на оценке общего титра антител к ТПО в обследуемой выборке и наличия статистически значимых различий клинико-иммунологических показателей в зависимости от их уровня в периферической крови в дебюте гипертиреоза Грейвса.

За точку разделения титра антител к ТПО при делении обследуемых больных на группы был взят клинически значимый уровень антител к ТПО равный более 100 мЕд/л [342]. Клинико-гормональная характеристика обследованных групп пациентов в зависимости от уровня антител к ТПО в дебюте заболевания представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от уровня антител к ТПО

(Me, Q₁– Q₃)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса (n = 180)	
		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95 2	антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85 3
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	0,08 (0,009 – 0,12) p ₁ < 0,001	0,007 (0,005 – 0,09) p _{1,2} < 0,001
свТ3, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	5,68 (4,21 – 7,62) p ₁ < 0,001	7,92 (5,23 – 9,23) p _{1,2} < 0,001
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	17,74 (14,11 – 27,72) p ₁ < 0,001	27,45 (11,39 – 31,42) p _{1,2} < 0,001
Антитела к рТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	13,28 (7,92 – 21,54) p ₁ < 0,001	14,72 (9,32 – 21,45) p ₁ < 0,001
Антитела к ТПО, мЕд/л	1,00 (0,00 – 3,00)	56,01 (39,32 – 78,33) p ₁ < 0,001	321,11 (192,23 – 543,24) p _{1,2} < 0,001
Объем щитовидной железы, мл	9,91 (9,41 – 12,63)	27,18 (19,31 – 41,47) p ₁ < 0,001	29,31 (20,65 – 43,31) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными

величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Установлено, что титр антител к рТТГ у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо не различался в зависимости от концентрации антител к ТПО и находился в сопоставимом диапазоне значений, как у больных с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л, так и при их уровне > 100 мЕд/л.

Следовательно, антитела к рТТГ являются основными аутоантителами, запускающими органоспецифический аутоиммунный процесс, но возрастание титра антител к ТПО до 100 мЕд/л в дебюте болезни Грейвса является важным, клинически значимым фактором явных изменений иммуноэндокринных взаимодействий. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса увеличение титра антител к ТПО более 100 мЕд/л пропорционально объему щитовидной железы и может являться чувствительным индикатором деструкции тиреоцитов, и генерализованной аутоиммунной дисфункции в дебюте заболевания.

3.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

При изучении фенотипического состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса как с манифестным так и с субклиническим тиретотоксикозом, обнаружено, что особенности клинико-иммунологических показателей зависят от титра антител к ТПО.

Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от уровня антител к ТПО представлен в таблице 3.

Наиболее выраженные изменения фенотипического состава лимфоцитов периферической крови в дебюте гипертиреоза Грейвса установлены у пациентов с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л.

У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л выявлено статистически значимое повышение абсолютного и процентного числа общей фракции лимфоцитов в сравнении с величинами, установленными в контрольной группе.

Таблица 3 – Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от уровня антител к ТПО (Ме, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль		Пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса (n = 180)			
	n = 85		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95		антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85	
	1		2		3	
	Ме	Q ₁ – Q ₃	Ме	Q ₁ – Q ₃	Ме	Q ₁ – Q ₃
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,80	4,80 – 7,00	5,05	4,55 – 6,15	6,00	4,50 – 8,20
Лимфоциты, %	38,56	32,21 – 41,83	41,72	34,23 – 48,32	44,51	39,43 – 51,25
			p ₁ = 0,010		p ₁ = 0,002	
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,01	1,68 – 2,33	2,12	1,75 – 2,63	2,81	1,87 – 3,61
					p ₁ = 0,002	
CD3 ⁺ , %	73,81	68,01 – 77,83	71,03	69,12 – 76,06	72,21	69,34 – 81,25
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	2,01	1,68 – 2,32	1,87	1,25 – 1,92	2,63	2,21 – 3,01
					p _{1,2} < 0,001	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,72	37,81 – 48,01	42,12	35,06 – 43,25	43,01	37,61 – 44,06
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,96	0,82 – 1,18	1,03	0,75 – 1,98	1,93	0,94 – 2,21
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	28,71	23,72 – 34,32	25,51	23,46 – 31,05	31,26	27,05 – 35,24
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,71	0,57 – 0,77	0,75	0,48 – 0,92	1,24	0,62 – 1,27
					p _{1,2} < 0,001	

Продолжение таблицы 3

Показатели	Контроль		Пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса (n = 180)			
	n = 85		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95		антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85	
	1		2		3	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,43	1,04 – 1,95	1,42	1,14 – 1,61	1,21	0,93 – 1,50
CD16 ⁺ /CD56 ⁺ , %	16,81	12,25 – 23,21	20,11	14,25 – 22,51	19,05	16,23 – 21,69
CD16 ⁺ /CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,39	0,28 – 0,61	0,39	0,33 – 0,58	0,55	0,23 – 0,64
CD19 ⁺ , %	11,21	10,03 – 14,61	11,19	9,72 – 16,23	14,21	12,32 – 16,87
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,24	0,22 – 0,34	0,32	0,21 – 0,39	0,39	0,31 – 0,72

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Установлено, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л абсолютное число Т-клеток (CD3⁺) в периферической крови повышено, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых у больных с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Кроме того, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л статистически значимо повышалось и абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), как относительно контрольных

значений, так и величин, установленных у пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Однако, абсолютное и процентное число Th-клеток ($CD3^+CD4^+$), а также процентное число цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, независимо от уровня антител к ТПО, статистически значимо не изменяется, в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе.

Установлено, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л увеличено, в сравнении с контрольными величинами, процентное и абсолютное количество В-лимфоцитов ($CD19^+$). Причем, процентное число $CD19^+$ -клеток у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л статистически значимо выше, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных у пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Следует подчеркнуть, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л установлено статистически значимое повышение процентного числа общей фракции Т-лимфоцитов относительно контрольных величин. Однако, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л статистически значимых изменений в популяционном и субпопуляционном составе относительно значений, выявляемых в контрольной группе, не установлено.

Показатели клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от уровня антител к ТПО представлены в таблице 4.

При анализе клинико-иммунологических показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, в зависимости от уровня антител к ТПО, установлено, что наиболее выраженные статистически значимые изменения показателей иммунной системы выявляются у больных при уровне антител к ТПО > 100 мЕд/л.

Таблица 4 – Показатели клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в зависимости от уровня антител к ТПО (Me, Q₁– Q₃)

Показатели	Контроль		Пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса (n = 180)			
	n = 85 1		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95 2		антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85 3	
			Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
Лейкоциты/CD3 ⁺	3,91	3,32 – 5,21	5,21	3,25 – 6,39	3,21	2,73 – 4,45
					p ₁ = 0,002	
Лейкоциты/CD19 ⁺	22,52	16,83 – 28,65	19,42	14,51 – 29,23	18,25	13,41 – 22,56
					p ₁ = 0,001	
Ig A, г/л	1,48	1,21 – 2,64	1,59	1,02 – 2,83	1,83	0,92 – 3,51
Ig M, г/л	1,46	1,01 – 1,56	1,42	1,12 – 1,87	0,96	0,82 – 1,77
Ig G, г/л	5,81	4,96 – 8,72	6,81	5,54 – 9,52	7,23	5,82 – 13,47
Ig A /CD19 ⁺ , нг/клетку	6,93	5,21 – 13,25	5,63	4,51 – 9,67	4,65	2,79 – 6,81
					p ₁ = 0,003	
Ig M /CD19 ⁺ , нг/клетку	5,51	4,21 – 8,27	4,91	3,47 – 7,82	2,76	1,91 – 6,89
					p ₁ = 0,010	
Ig G /CD19 ⁺ , нг/клетку	28,56	20,21 – 45,42	25,34	16,23 – 40,01	21,45	13,21 – 46,51

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л состояние клеточного и гуморального иммунитета характеризуется увеличением количества Т- и В-лимфоцитов, что относительно общего уровня лейкоцитов подтверждается снижением величин лейко-Т-(лейкоциты/ $CD3^+$) и лейко-В-клеточного (лейкоциты/ $CD19^+$) коэффициентов относительно контрольных величин.

Причем, выявленное повышенное количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л, по-видимому, связано с выходом молодых, функционально незрелых форм в периферический кровоток, о чем свидетельствует статистически значимое снижение уровня относительного синтеза IgA(IgA/ $CD19^+$) и IgM (Ig M / $CD19^+$).

При корреляционном анализе у лиц контрольной группы выявляется единственная статистически значимая связь уровня антител к ТПО с концентрацией IgA в сыворотке крови ($r = 0,59$, $p = 0,001$). У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л установлены положительные связи титра антител к ТПО с абсолютным и процентным содержанием В-лимфоцитов ($CD19^+$), соответственно, $r = 0,57$, $p = 0,002$ и $r = 0,60$, $p = 0,004$. Также, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л выявлена отрицательная связь титра антител к ТПО с лейко-В-клеточным коэффициентом ($r = - 0,68$, $p = 0,006$). Обращает на себя внимание, установленная у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л сильная отрицательная корреляция уровня антител к ТПО с процентным количеством Т-лимфоцитов ($CD3^+$) ($r = - 0,85$, $p < 0,001$) и умеренная отрицательная взаимосвязь с относительным синтезом IgM ($r = - 0,63$, $p = 0,010$). У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л статистически значимых связей содержания антител к ТПО с показателями клеточного и гуморального иммунитета не обнаружено. Следует подчеркнуть, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, независимо от уровня антител к ТПО в дебюте заболевания, взаимосвязей титра антител к рТТГ с показателями фенотипиче-

ского состава лимфоцитов периферической крови, а также с показателями клеточного и гуморального иммунитета не обнаружено.

Таким образом, аутоантитела к рТТГ играют ключевую роль и являются иницирующими в развитии аутоиммунной реакции при болезни Грейвса, но проявление дефекта иммунорегуляции в дебюте заболевания определяется цитотоксическими антителами к ТПО. У пациентов с уровнем антител к ТПО >100 мЕд/л повышено абсолютное и процентное число общей фракции лимфоцитов, абсолютное количество Т-клеток ($CD3^+$), и абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), а также процентное и абсолютное содержание В-лимфоцитов ($CD19^+$) в периферической крови, при отсутствии статистически значимых связей содержания антител к ТПО с иммунологическими показателями.

У пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л, напротив, нарушения в системе иммунитета реализуются на уровне иммунотиреоидных взаимодействий с появлением в системе положительных корреляций титра антител к ТПО с относительным и абсолютным содержанием В-лимфоцитов ($CD19^+$), и отрицательных с процентным количеством Т-лимфоцитов ($CD3^+$), лейко-В-клеточным коэффициентом, а также относительным синтезом IgM (IgM / $CD19^+$).

Полученные данные в разрезе современных представлений об иммунодоминантных серологических детерминантах ТПО-специфических аутоантител [78] можно заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л антитела к микросомальному антигену связаны с ТПО-специфическими Т-клетками, которые играют ключевую роль в аутоиммунной деструкции тиреоцитов и, вероятно, приобретают свойства цитотоксических аутоантител только в условиях гиперсекреции тиреоидных гормонов.

Отсутствие взаимосвязей показателей тиреоидного статуса с клинико-иммунологическими маркерами в сочетании с установленной положительной корреляцией объема щитовидной железы с уровнем антител к микросомальному антигену у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л может указывать на то, что увеличение титра антител к ТПО при впервые выявленном гипертиреозе Грейвса пропорционально пролиферации тиреоцитов, а следовательно,

низкой видовой специализации гормонпродуцирующих клеток. Вероятно, поэтому у пациентов с болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л иммунноти-реодные взаимосвязи становятся менее значимыми.

3.3. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

Избыточная секреция гормонов щитовидной железы при тиреотоксикозе аутоиммунного генеза создает гиперметаболическое состояние, характеризующееся насыщением физиологических антиоксидантных систем за счет высокого потребления внутриклеточного АТФ и кислорода, разобщением дыхательной цепи митохондрий, дисфункция которой способствует выработке АФК в периферических тканях и в щитовидной железе, и вызывает окислительный стресс у пациентов с болезнью Грейвса [139]. С одной стороны, щитовидная железа использует АФК для выработки гормонов, с другой стороны, тиреоциты выделяют ферменты, которые катализируют образование АФК [317]. Окислительный стресс при болезни Грейвса, может привести к повреждению периферических тканей, способствуя, как клиническому проявлению тиреотоксикоза, так и цитопатогенному воздействию на тиреоциты с последующей потерей аутоотолерантности к собственным антигенам щитовидной железы [39].

Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [59, 90]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве, и является субстратом для микросомальных НАД(Ф)Н-зависимых оксидоредуктаз [127, 290]. В свою очередь люминол-зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность вторичных АФК, преимущественно синглетного кислорода и гидроксильного радикала [207].

Соответственно, исследование люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов позволило охарактеризовать уровень продукции

первичных и вторичных АФК у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса для оценки реализации механизма внешнего киллинга клетками иммунной системы в тиреотоксическую фазу заболевания.

Предварительный анализ показал, что кинетика хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса не зависит от степени тяжести гипертиреоза, титра антител к рТТГ и ТПО. При исследовании уровня продукции АФК в нейтрофилах периферической крови методом хемилюминесценции у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса обнаружены значительные отличия от показателей контрольной группы.

Хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса представлена в таблице 5. При исследовании спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса установлено значительное повышение показателя S, отражающего суммарную продукцию первичных АФК. Однако, показатели скорости (Tmax) и максимально уровня синтеза (Imax) первичных АФК статистически значимо не изменялись, относительно контрольных значений.

В ходе зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса выявлено статистически значимое снижение скорости (Tmax) при более чем десятикратном повышении суммарного синтеза (S) первичных АФК.

Индекс активации (Синд./Спонт.) люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо не изменялся, что свидетельствует об отсутствии компенсаторных возможностей данной клеточной популяции в поддержании соотношения общего количества вырабатываемых нейтрофилами первичных АФК, как при базовом уровне реактивности, так и при антигенной нагрузке.

Наиболее выраженные изменения в реализации кислородного метаболизма нейтрофилов периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса установлены в системе продукции вторичных АФК.

Таблица 5 – Хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль		Впервые выявленная болезнь Грейвса		p
	n = 85		n = 180		
	1		2		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Люцигенин-зависимая спонтанная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	1741	1398 – 2057	1743	1740 – 2297	-
I _{max} , о.е. × 10 ³	10,15	0,87 – 28,59	8,74	2,43 – 15,51	-
S, о.е.× сек. × 10 ⁶	1,74	1,03 – 3,71	11,72	10,41 – 50,76	0,007
Люцигенин-зависимая зимозан-индуцированная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	1275	809 – 1768	1042	810 – 1384	0,003
I _{max} , о.е. × 10 ³	12,78	6,45 – 42,81	10,39	1,27 – 15,98	-
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31	1,45 – 8,18	39,72	18,18 – 114,56	0,001
Синд./ Спонт.	1,89	0,99 – 3,22	2,21	1,33 – 4,23	-
Люминол-зависимая спонтанная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	987	627 – 2174	1096	809 – 2131	-
I _{max} , о.е. × 10 ³	39,85	7,73 – 66,61	61,25	11,23 – 85,23	0,002
S, о.е.× сек. × 10 ⁶	5,37	3,08 – 13,45	127,44	24,15 – 305,28	0,010
Люминол-зависимая зимозан-индуцированная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	912	631 – 1188	764	737 – 977	0,006
I _{max} , о.е. × 10 ³	147,24	17,75 – 247,37	191,25	34,83 – 269,75	0,010
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	16,05	6,59 – 35,74	67,51	16,81 – 92,12	0,001
Синд./ Спонт.	2,26	1,34 – 3,95	3,25	2,89 – 4,82	-

Примечание. p — статистически значимые различия с контрольными величинами.

При спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса установлено статистически значимое повышение показателей максимально уровня (I_{\max}) и суммарного синтеза (S) вторичных АФК, соответственно, в 1,5 раз и 23,7 раз, относительно контрольных величин. Однако, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса при спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови показатель скорости генерации в системе вторичных АФК соответствовал значениям, выявляемым в контрольной группе.

При зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, также, установлено статистически значимое повышение показателей максимально уровня (I_{\max}) и суммарного синтеза (S), но при замедлении скорости (T_{\max}) синтеза вторичных АФК. Индекс активации (Синд./Спонт.) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо не изменялся относительно величин, установленных в контрольной группе, что отражает дисбаланс механизмов, регулирующих продукцию вторичных кислородных радикалов.

С помощью корреляционного анализа исследованы взаимосвязи между показателями генерации первичных и вторичных АФК в нейтрофилах крови и параметрами тиреоидного статуса. Установлено, что у лиц контрольной группы концентрация ТТГ отрицательно взаимосвязана с T_{\max} спонтанной ($r = - 0,81$, $p = 0,010$) и индуцированной ($r = - 0,95$, $p = 0,004$) люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Также, у лиц контрольной группы концентрация свТ4 отрицательно коррелирует с показателями I_{\max} и S спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции, соответственно, $r = - 0,85$, $p = 0,004$ и $r = - 0,87$, $p = 0,020$, а также с T_{\max} ($r = - 0,86$, $p = 0,001$) и S ($r = - 0,92$, $p = 0,002$) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

В группе пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса установлены отрицательные взаимосвязи только между уровнем антител к ТПО в сыворотке крови и T_{\max} ($r = - 0,76$, $p = 0,030$) и I_{\max} ($r = - 0,81$, $p = 0,020$) зимозан-

индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции. Исходя из результатов корреляционного анализа, можно заключить, что при впервые выявленной болезни Грейвса значительно нарушена тиреоидная регуляция генерации АФК в нейтрофилах крови. Так, если у лиц контрольной группы с кинетическими показателями синтеза первичных АФК коррелируют только ТТГ и свТ4, то у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса выявляются взаимосвязи только между уровнем антител к ТПО в сыворотке крови и кинетическими параметрами синтеза вторичных АФК. Причем, как у пациентов с субклиническим, так и с манифестным гипертиреозом в дебюте болезни Грейвса взаимосвязи между показателями уровня синтеза АФК в нейтрофилах и тиреоидными гормонами теряются, но появляется связь между показателем скорости синтеза вторичных АФК в нейтрофилах крови и концентрацией антител к ТПО.

Таким образом, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса нарушения кислородного метаболизма нейтрофилов периферической в условиях гипертиреоза, преимущественно затрагивают вторичные АФК. Но в то же время, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса при высокой суммарной продукции АФК отсутствует компенсаторное изменение соотношения общего количества первичных и вторичных кислородных радикалов (Синд./Спонт.). Следовательно, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса нарушены внутриклеточные регуляторные механизмы, ответственные за оптимальное соотношение высокоэнергетических оксидантов в нейтрофилах.

Установлено, что при впервые выявленной болезни Грейвса значительно нарушена тиреоидная регуляция образования вторичных АФК в нейтрофилах крови, что отражается в появлении отрицательных связей уровня цитотоксических антител к ТПО с кинетическими параметрами люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (T_{max} , I_{max}). Можно предположить, что при впервые выявленном гипертиреозе Грейвса, с усилением аутоиммунного процесса и уровня оксидативного стресса, реактивность нейтрофилов периферической крови снижается за счет замедления скорости продукции АФК и миграции активированных клеток в ткань щитовидной железы.

3.4. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

Механизмы стимуляции иммунной системы при развитии гипертиреоза аутоиммунного генеза при манифестации болезни Грейвса до сих пор изучены не полностью, но считается, что они носят мультифакториальный генез, с воздействием как эндогенных, так и экзогенных факторов, у генетически предрасположенных индивидуумов [59, 99, 181].

В качестве исследуемых показателей внутриклеточного обмена нейтрофилов выбраны уровни активности никотинамидадениндинуклеотид- (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых (НАДФ) дегидрогеназ в связи с тем, что данный класс ферментов осуществляет распределение субстратных потоков по основным метаболическим путям клеток, поддерживая энергетические и пластические процессы [47, 222, 245]. При предварительном сравнительном исследовании активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов в зависимости от степени тяжести тиреотоксикоза было установлено, что пациенты с субклиническим и манифестным тиреотоксикозом на момент постановки диагноза имеют не только сопоставимые изменения клинко-иммунологических показателей, в том числе и по уровню антител к рТТГ, но и исследуемой активности ферментов нейтрофилов. При изучении уровня активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса установлено, что в дебюте гипертиреоза аутоиммунного генеза внутриклеточный метаболизм клеток иммунной системы имеет выраженные отличия от показателей контрольной группы.

Установлено, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо относительно контрольных значений повышается активность Г6ФДГ (рисунок 3 а) и более чем в 2 раза активность НАДФ-ИЦДГ (рисунок 3 б). Соответствующим образом, относительно контрольного диапазона, в нейтрофилах крови пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса повышается активность НАДФ-зависимых МДГ (рисунок 3 в) и ГДГ (рисунок 3 г).

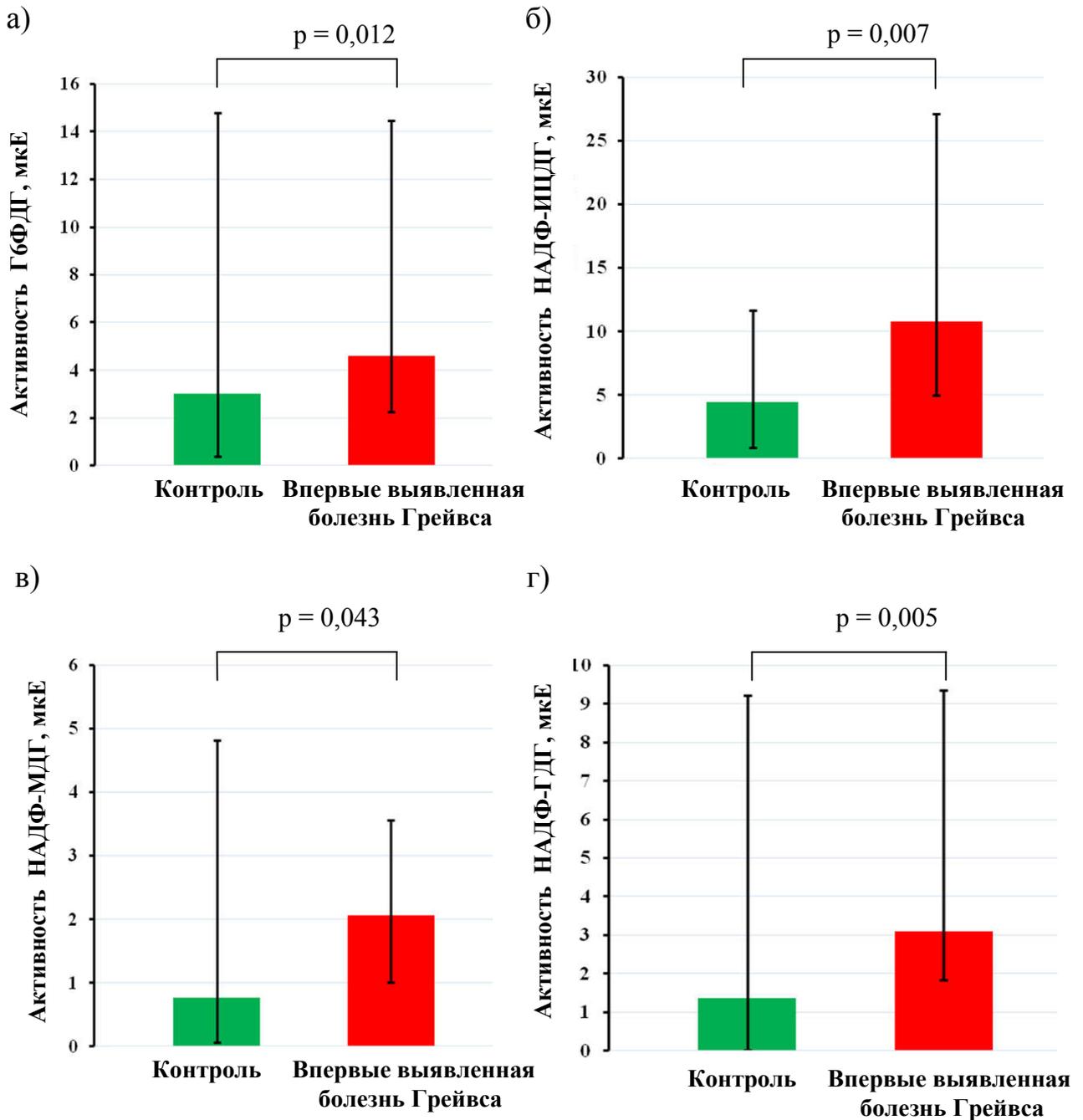


Рисунок 3 – Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

Следовательно, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в нейтрофилах крови повышается интенсивность пентозофосфатного цикла (ПФЦ) и активируются механизмы внутриклеточной антиоксидантной защиты за счет усиления выработки НАДФН [137].

Установлено, что у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в нейтрофилах крови в 3,8 и 1,7 раз, относительно контрольных значений, снижены уровни активности, соответственно, НАД-МДГ и НАД-ЛДГ (рисунок 4 а, б). Однако, активность ГДГ и ИЦДГ в нейтрофилах пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса соответствует контрольным значениям (рисунок 4 в, г).

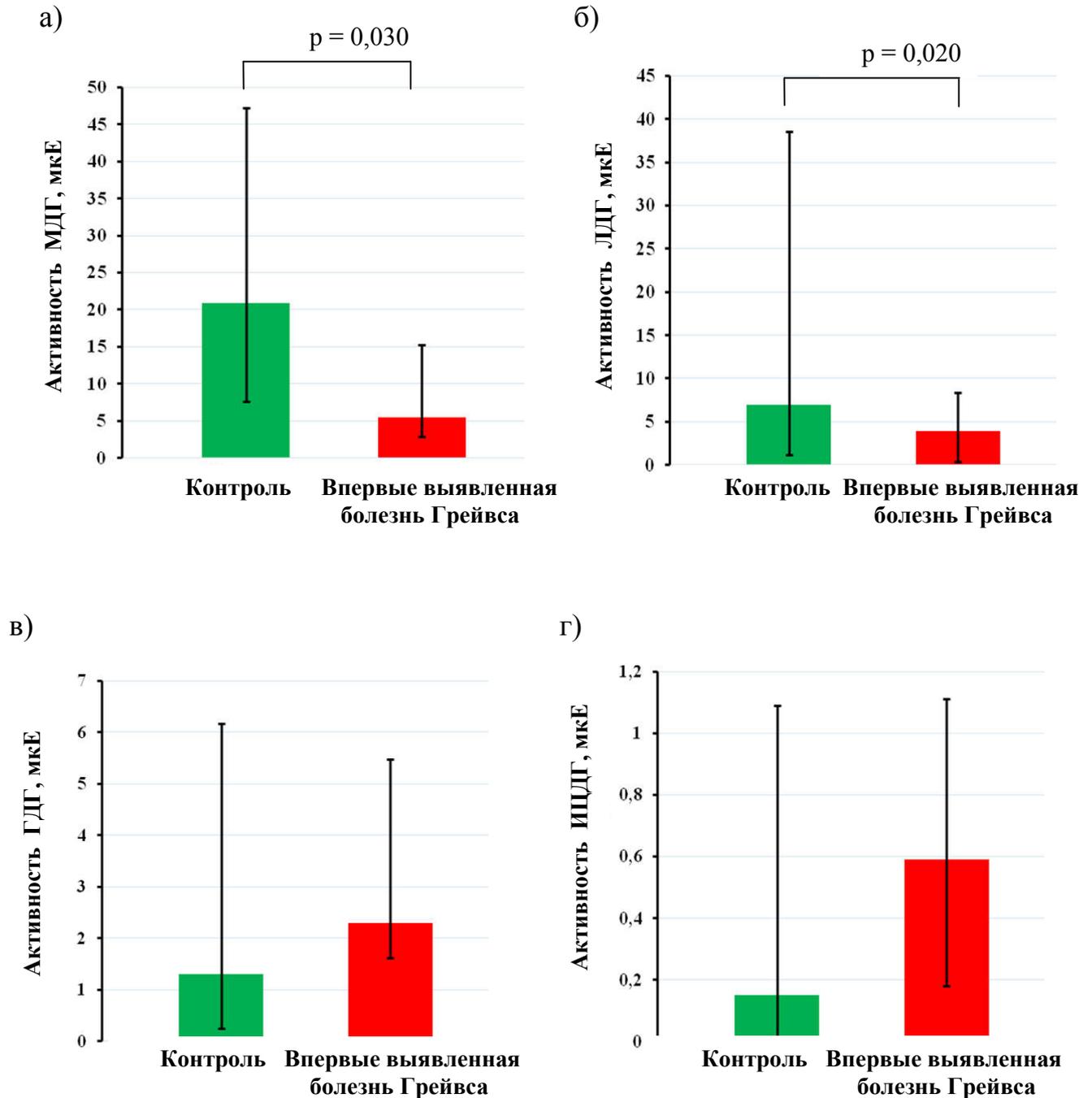


Рисунок 4 – Активность НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

В то же время, обнаружено, что активность обратных дегидрогеназных реакций – НАДН-зависимых реакций ЛДГ, МДГ, ГДГ, а также НАДФН-ГДГ у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо выше в сравнении с показателями ферментативной активности, выявляемыми в контрольной группе (рисунок 5 а, б, в, г).

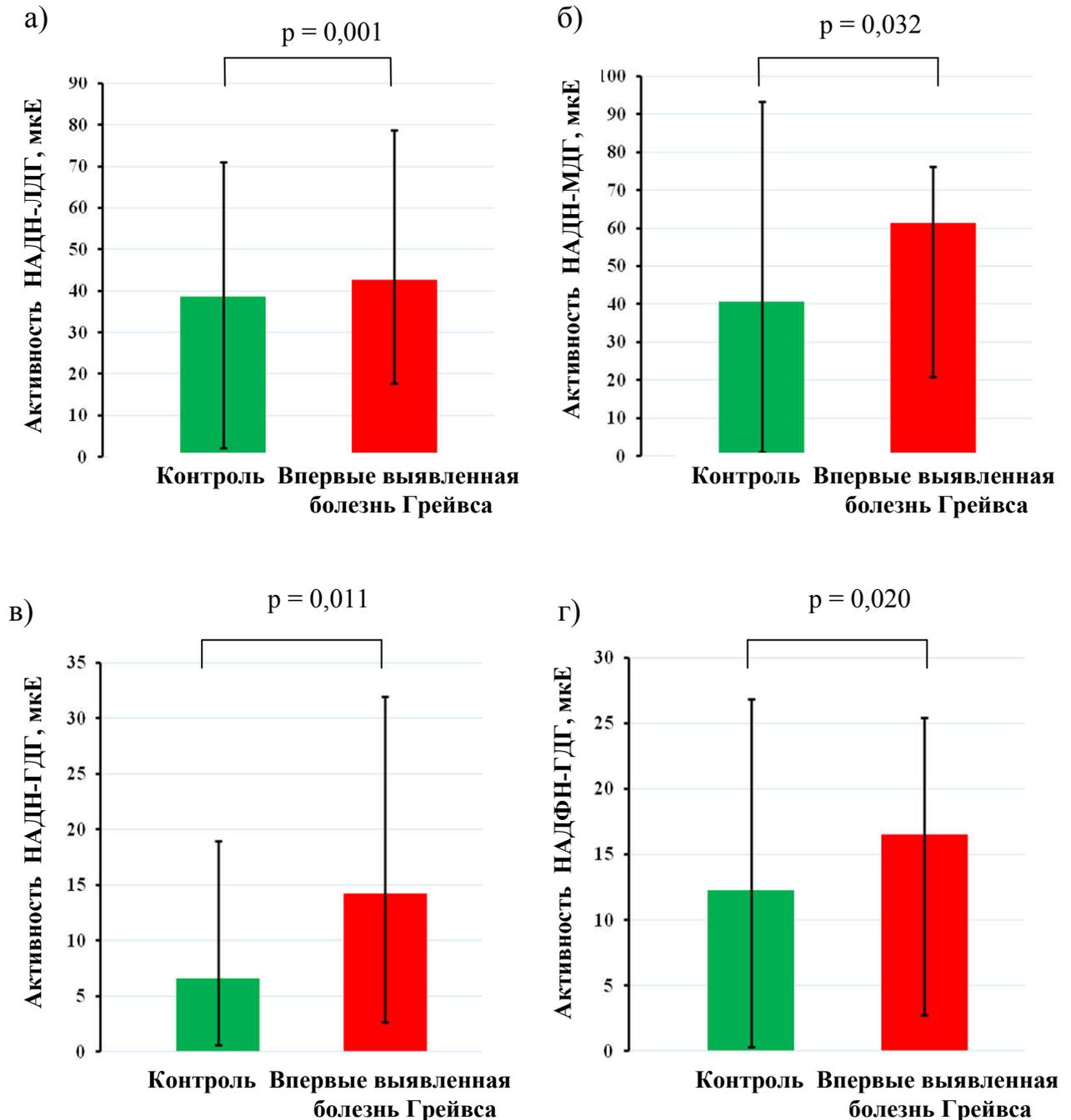


Рисунок 5 – Активность НАДН-и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

При этом, уровень активности ГЗФДГ и глутатионредуктазы (ГР) в нейтрофилах у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса статистически значимо не изменялся относительно значений активности ферментов, установленных в контрольной группе (рисунок 6 а, б).

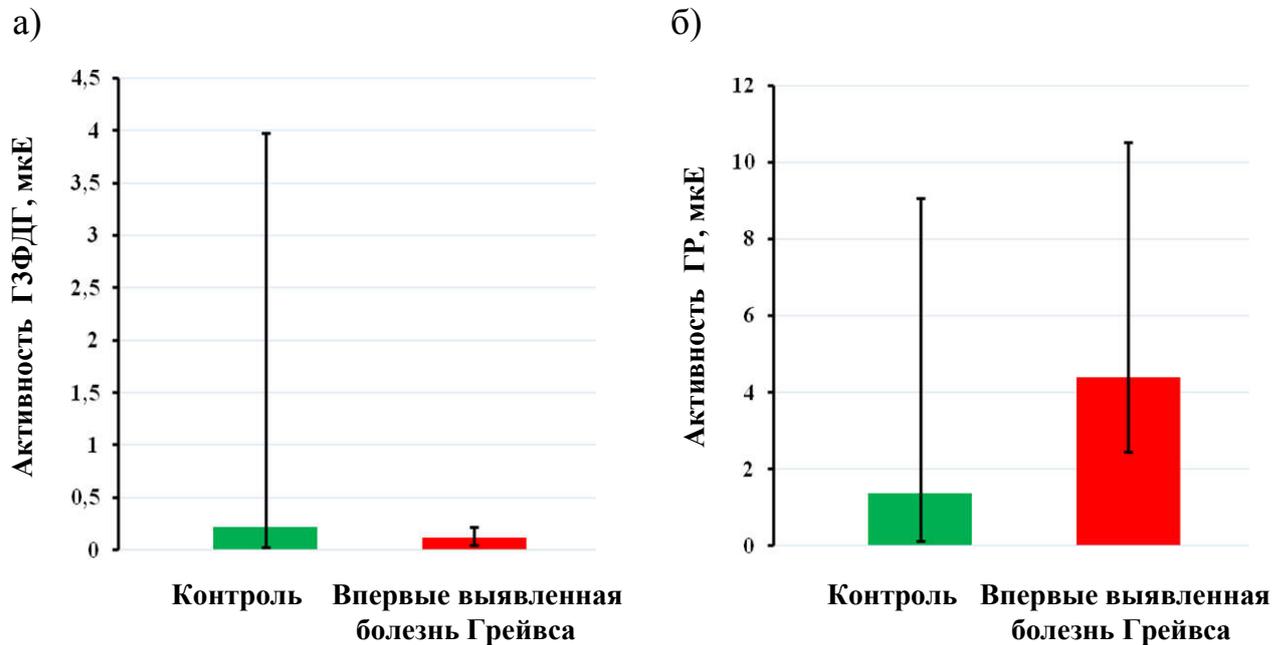


Рисунок 6 – Активность НАД-зависимых ГЗФДГ и ГР нейтрофилов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

При проведении корреляционного анализа были установлены взаимосвязи между уровнями тиреоидных гормонов и показателями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови.

У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса выявлены две сильные положительные корреляции: между уровнем свТ3 и показателем активности МДГ ($r = 0,91$, $p = 0,032$) и уровнем свТ4 и активностью НАДФ-ИЦДГ ($r=0,83$, $p=0,006$). В контрольной группе данные взаимосвязи не прослеживались.

Таким образом, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса выявлены существенные отличия в ферментативном статусе и тиреоидной регуляции внутриклеточного метаболизма клеток иммунной системы.

Снижение в 3,8 раз активности МДГ на фоне повышения более чем в 2 раза активности НАДФ-ИЦДГ в нейтрофилах крови пациентов с впервые выявленной

болезнью Грейвса и появление прямых связей уровней свТ3 и свТ4 с активностью, соответственно, МДГ и НАДФ-ИЦДГ на системном уровне позволяет отнести их к важным маркерам дальнейшего прогрессирования аутоиммунного процесса, независимо от уровня антител к рТТГ.

Таким образом, гипертиреоз аутоиммунного генеза вызывает стойкие изменения внутриклеточного метаболизма нейтрофилов, о чем свидетельствует снижение активности МДГ и разнонаправленное изменение уровней активности ЛДГ и НАДН-зависимой ЛДГ, а также МДГ и НАДН-зависимой МДГ. Понижение активности НАД-зависимой реакции МДГ отражает снижение активности аэробного дыхания [211]. Метаболическая значимость НАДФ-зависимой реакции ГДГ определяется субстратным обменом между ЦТК и ферментативными процессами аминокислотного обмена. Повышение активности НАДФ-зависимой реакции ГДГ, выявленное в нейтрофилах в гипертиреоидную фазу болезни Грейвса направлено на сохранение интенсивности субстратного потока по ЦТК. Необходимо отметить, что имеются исследования, подтверждающие влияние внутриклеточного обмена глутамата на функциональную активность клеток иммунной системы [234].

Полученные результаты позволяют заключить, что выявленные особенности продукции первичных и вторичных АФК, а также изменения механизмов, ответственных за реализацию кислородного метаболизма нейтрофилов крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса могут влиять не только на развитие полноценного цитопатогенного эффекта нейтрофилов при развитии аутоиммунного процесса, но и определять эффективность длительной консервативной терапии тиамазолом в дебюте заболевания. Выраженная активация обменных процессов в митохондриальном компартменте, за счет активации НАДН-ГДГ нейтрофилов, у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса свидетельствует об активации компенсаторных механизмов ингибирования перекисного окисления липидов в гипертиреоидную фазу заболевания.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ТИАМАЗОЛОМ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

4.1. Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом

Болезнь Грейвса характеризуется развитием тиреотоксикоза, вызванного циркуляцией антител к рТТГ, которые усиливают индуцируемую ИФН- γ экспрессию молекул HLA-DR и презентацию тиреоидных антигенов, способствуя дальнейшей активации Th-клеток, что клинически может проявляться, как стимуляцией, так и ингибированием функции щитовидной железы [301].

Остаются до сих пор неизвестными влияния консервативной терапии тиамазолом на дефект недостаточной активации Treg и формирование дефектных регуляторных механизмов в иммунной системе при болезни Грейвса [171, 356, 370]. Однако, эффективный контроль аутоиммунного процесса при болезни Грейвса предопределяет необходимость поиска иммунологических маркеров прогрессирования заболевания при достижении медикаментозного эутиреоза для определения вектора направления иммунотропного лечения с учетом иммуномодулирующих влияний консервативной терапии тиамазолом. В связи с этим, задачей настоящего этапа исследования являлось изучить фенотипический состав Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза.

В основу формирования подгрупп пациентов с болезнью Грейвса была заложена концепция иммуномодулирующего эффекта консервативной терапии тиамазолом при условии стойкого медикаментозного эутиреоза, индуцированного непрерывным приемом тиреостатика [30]. Выбор сроков для клинико-иммунологического обследования, при оценке иммуномодулирующих эффектов консервативной терапии, у пациентов с болезнью Грейвса базировался на стабиль-

ности достигнутого медикаментозного эутиреоза и результирующего действия тиамазола, использовавшегося по стандартному протоколу консервативного лечения заболевания [14]. Стойкая нормализация гормонов щитовидной железы включала, в том числе, стабилизацию уровня ТТГ в пределах нормального референсного диапазона.

Предварительный анализ показал, что сроки поддержания состояния стойкого медикаментозного эутиреоза, на фоне непрерывного приема тиамазола, у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса варьируют от 5 до 12 месяцев и более. В связи с этим, пациентки со стойким медикаментозным эутиреозом были разделены на репрезентативные подгруппы внутри указанного периода наблюдения, а также с учетом рекомендуемых сроков консервативного лечения заболевания согласно национальным клиническим рекомендациям. Изучаемая популяция пациентов с болезнью Грейвса была разделена на три группы: первая – продолжительность медикаментозного эутиреоза от 5 до 8 месяцев, вторая – продолжительность медикаментозного эутиреоза от 9 до 12 месяцев, третья – продолжительность медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев. Оценивали хронологию развития заболевания, с уточнением времени от момента манифестации гипертиреоза, верификации диагноза болезни Грейвса и инициации тиреостатической терапии, дозу тиамазола, гормональные показатели, титр антител к рТТГ исходно и на фоне медикаментозного лечения, а также продолжительность консервативной терапии тиамазолом.

В исследование было включено 135 женщин с верифицированным диагнозом болезни Грейвса, средний возраст $43,14 \pm 12,84$ лет, из них 120 (89,00 %) с рецидивом заболевания и 15 (11,00 %) с впервые выявленным гипертиреозом. При ретроспективном анализе показателей тиреоидного статуса в дебюте заболевания было установлено, что у обследованных пациентов с болезнью Грейвса первой и второй групп был диагностирован субклинический или манифестный гипертиреоз, соответственно, $\text{ТТГ} = 0,07$ мЕд/л (0,003 – 0,39), $\text{свТ3} = 5,92$ пмоль/л (4,61 – 7,51), $\text{свТ4} = 17,33$ пмоль/л (12,19 – 25,77) и $\text{ТТГ} = 0,05$ мЕд/л (0,01– 0,89), $\text{свТ3} = 6,3$ пмоль/л (4,31 – 7,43), $\text{свТ4} = 21,52$ пмоль/л (14,11 – 36,77). У большинства пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев

группы показатели тиреоидного статуса в дебюте заболевания соответствовали субклиническому гипертиреозу: ТТГ = 0,03 мЕд/л (0,09 – 0,36), свТ3 = 5,12 пмоль/л (3,92 – 6,31), свТ4 = 16,41 пмоль/л (12,88 – 18,78).

При ретроспективном сравнительном анализе исходных показателей тиреоидного статуса и уровня антител к рТТГ подгрупп пациентов с болезнью Грейвса, в дальнейшем обследованных в зависимости от продолжительности медикаментозного эутиреоза, статистически значимых различий не выявлено.

Независимо от продолжительности медикаментозного эутиреоза в периферической крови обследуемых пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания был повышен процентный уровень Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$), соответственно, Me = 66,42 % (44,23 – 74,61), у лиц контрольной группы – Me = 41,72 % (37,81 – 48,01), $p = 0,011$ и Me = 5,51% (4,12–6,73), у лиц контрольной группы – Me = 0,12 % (0,03 – 0,68), $p = 0,013$. Процентное количество Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в крови у всех обследуемых пациентов с болезнью Грейвса на момент манифестации заболевания было снижено – Me = 1,21 % (0,92 – 1,81), у лиц контрольной группы – Me = 1,55 % (0,83 – 3,09) $p = 0,021$.

Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом представлена в таблице 6. На момент клинико-иммунологического обследования у всех пациентов был достигнут индуцированный тиамазолом медикаментозный эутиреоз, что подтверждалось при объективном осмотре и соответствующими показателями тиреоидного статуса. Следует подчеркнуть, что независимо от длительности медикаментозного эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии тиамазолом определялся положительный титр антител к рТТГ.

Установлено, что у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса уровень антител к рТТГ статистически значимо повышен относительно контрольных значений и не различается в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом.

Таблица 6 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Группа 1 Медикамент. эутиреоз 5 - 8 мес. n = 41 2	Группа 2 Медикамент. эутиреоз 9 - 12 мес. n = 69 3	Группа 3 Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
Возраст, лет (M ± SD)	41,02 ± 12,11	43,91 ± 13,76	42,94 ± 12,24	42,43 ± 13,09
Продолжительность приема тиамазола, мес.	–	7,0 (6,0 – 8,0)	11,0 (10,0 – 12,0)	16,0 (14,0 – 24,0)
Доза тиамазола, мг	–	10,0 (10 – 20)	10,0 (10 – 20)	10,0 (10 – 15)
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	0,78 (0,41 – 2,11) p ₁ < 0,001	1,09 (0,55 – 3,43) p ₁ < 0,001	1,91 (0,57 – 5,31) p ₁ = 0,004
свТ3, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	5,31 (3,83 – 6,31) p ₁ < 0,001	4,73 (3,82 – 5,93) p ₁ < 0,001	2,24 (2,93 – 5,12) p ₁ = 0,027
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	13,07 (10,49 – 16,91) p ₁ < 0,001	12,83 (10,19 – 16,97) p ₁ < 0,001	15,57 (11,83 – 17,43) p ₁ = 0,022 p ₃ = 0,030

Продолжение таблицы 6

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Группа 1 Медикамент. эутиреоз 5 - 8 мес. n = 41 2	Группа 2 Медикамент. эутиреоз 9 - 12 мес. n = 69 3	Группа 3 Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
Антитела к pТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	15,03 (9,45 – 21,04) $p_1 < 0,001$	15,27 (9,45 – 21,45) $p_1 < 0,001$	15,62 (9,32 – 24,52) $p_1 < 0,001$
Антитела к ТПО, мЕд/л	1,00 (0,00 – 3,00)	223,21 (13,01 – 563,11) $p_1 < 0,001$	227,21 (29,13 – 695,51) $p_1 < 0,001$	632,00 (78,00 – 1186,00) $p_1 = 0,003$ $p_{2,3} < 0,001$
Объем щито- видной железы, мл	9,91 (9,41 – 12,63)	29,19 (20,41 – 45,32) $p_1 < 0,001$	32,21 (20,51 – 49,88) $p_1 < 0,001$	27,36 (16,65 – 50,61) $p_1 < 0,001$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с контрольными величинами, p_2 — статистически значимые различия с показателями пациентов 1 группы, p_3 — статистически значимые различия с показателями пациентов 2 группы.

Следует отметить, что у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом, выявлялся статистически значимо повышенный, относительно контрольных величин, уровень антител к ТПО. Причем, наиболее высокий титр антител к микросомальной фракции тиреоцитов зафиксирован у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев.

Более того, у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев уровень антител к ТПО статистически значимо выше не только относительно контрольных значений, но и величин, выявляемых у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Выявленная закономерность в продукции антител к различным антигенам щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса при длительном медикаментозной эутиреозе указывает на то, что антитела к рТТГ являются специфическим маркером последующего развития заболевания, а антитела к ТПО определяют аутоиммунную дисфункцию, независимо от компенсации гипертиреоза и длительности эутиреоидного состояния при консервативной терапии тиамазолом.

Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза представлен в таблице 7. При изучении фенотипического состава Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза были выявлены статистически значимые различия, как относительно контрольных показателей, так и значений выявляемых у пациентов с разной продолжительностью эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза в течение 5 – 8 месяцев процентное число Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) повышено в сравнении с контрольным диапазоном. У пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев уровень Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) соответствует контрольным значениям. У пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев содержание Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) статистически значимо ниже, чем у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев.

Выявлено, что у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев и 9 – 12 месяцев уровень цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) значительно ниже контрольных значений, но у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев содержание цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) соответствует контрольному диапазону.

Таблица 7 – Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикмент. эутиреоз 5 - 8 мес. n = 41 2	Медикамент. эутиреоз 9 - 12 мес. n = 69 3	Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	2,01 (1,68 – 2,32)	2,00 (1,14 – 2,52)	1,59 (1,17 – 2,03)	1,81 (0,63 – 2,29)
CD3 ⁺ , %	72,81 (68,01 – 77,83)	77,6 (69,21 – 84,62)	74,41 (66,81 – 78,41)	70,95 (58,91 – 75,49)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,21 (0,03 – 1,70)	1,18 (0,33 – 3,07)	1,41 (0,66 – 2,52) p ₁ = 0,040 p ₂ = 0,027	2,67 (1,74 – 4,02) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,038 p ₃ = 0,043
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,72 (37,81 – 48,01)	52,74 (38,41 – 55,43) p ₁ = 0,031	49,73 (39,92 – 54,41)	40,01 (34,41 – 48,32) p ₂ = 0,042
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	28,71 (23,72 – 34,32)	25,12 (21,52 – 26,24) p ₁ = 0,014	22,31 (20,01 – 28,73) p ₁ < 0,001	29,32 (18,31 – 36,33)

Продолжение таблицы 7

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикамент. эутиреоз 5 – 8 мес. n = 41 2	Медикамент. эутиреоз 9 – 12 мес. n = 69 3	Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,12 (0,03 – 0,68)	0,94 (0,48 – 1,45) p ₁ = 0,020	0,95 (0,41 – 1,80) p ₁ = 0,025	1,65 (0,78 – 2,97) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,036 p ₃ = 0,038
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,06 (0,03 – 0,17)	0,31 (0,03 – 1,05)	0,33 (0,12 – 0,94) p ₁ = 0,045	0,99 (0,52 – 1,88) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,043 p ₃ = 0,032
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	1,55 (0,83 – 3,09)	3,01 (1,88 – 4,47) p ₁ = 0,024	5,52 (2,77 – 11,61) p ₁ < 0,001	3,21 (1,04 – 4,30) p ₁ = 0,048 p ₃ = 0,039

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов 1 группы, p₃ — статистически значимые различия с показателями пациентов 2 группы.

Установлено, у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев процентное число активированных Th-клеток (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) статистически значимо выше контрольных величин, и еще более возрастает в группе больных с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев.

Причем, у пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев количество активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) статистически значимо возрастает, как относительно контрольных значений, так и величин, установленных у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

При изучении фенотипического состава T-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза установлено, что у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев процентное содержание в крови активированных цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) соответствует контрольным значениям. Однако, у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев уровень цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) значительно выше контрольного.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от продолжительности медикаментозного эутиреоза, относительно показателей контрольной группы, в периферической крови повышено процентное количество Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$). Однако, следует подчеркнуть, что у больных с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев выявлено снижение содержания Treg относительно уровня, установленного у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев. Причем, необходимо отметить, что у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от продолжительности медикаментозного эутиреоза меняется именно фенотипический состав T-лимфоцитов, в то время как процентное и абсолютное количество общих T-клеток ($CD3^+$) в крови остается постоянным и не отличается от контрольных величин.

Анализ фенотипического состава T-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса позволил установить особенности изменений процентного числа Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+$) при разной длительности медикаментозного эутиреоза, что представляется значи-

мым, так как именно в составе субпопуляции Th-клеток находится фракция Treg, которая реализует регуляторную функцию иммунного ответа [370].

Обнаружено, что если у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев в крови выявляется повышенный, относительно контрольных значений, уровень Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и сниженное количество цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), то у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев содержание Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) нормализуется, тогда, как количество цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) остается пониженным. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев наблюдается еще более пониженный уровень Th-клеток ($CD3^+CD4^+$), относительно значений, выявляемых у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев, но при нормализации количества цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) в периферической крови и соответствии их уровня контрольным значениям.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса уже при поддержании стойкого медикаментозного эутиреоза в течение 5 – 8 месяцев наблюдается иммуномодулирующий эффект консервативной терапии тиамазолом, заключающийся в значительном увеличении процентного количества Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$). У пациентов с болезнью Грейвса с большей продолжительности медикаментозного эутиреоза, длительностью 9 – 12 месяцев, процентное содержание Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) достигает максимума. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев процентное число Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в крови снова снижается, но сохраняется компенсаторное повышение относительно контроля. В этой связи следует упомянуть и о том, что именно у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза, более 12 месяцев выявляется максимально высокий уровень антител к ТПО, как относительно контрольных показателей, так и значений, установленных у больных с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Увеличение доли Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от продолжительности медикаментозного эутиреоза свидетельствует о том, что длительное лечение тиамазолом способствует однонаправленным изменениям: развитию медикаментозного эутиреоза и частичному восстановлению регуляторного потенциала Treg. Можно предположить, что повышение уровня Treg у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от длительности медикаментозного эутиреоза, является компенсаторной иммунной реакцией, направленной на преодоление дефекта резистентности к супрессорному действию Treg, необходимых на любой стадии процесса постоянной антигензависимой активации Th-клеток при болезни Грейвса. Но, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев, в отличие от больных с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев, в связи с более длительным периодом циркуляции антител к рТТГ, вероятно, наблюдается персистенция аутоиммунного процесса, проявляющаяся снижением Treg и нарастанием цитотоксических антител к ТПО, независимо от стойкости эутиреоидного состояния.

Кроме оценки субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза, также было исследовано содержание активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD25^+$). В качестве активационного маркера был исследован маркер CD25. Молекула CD25 представляет собой гликопротеин, являющейся низкоаффинным рецептором к IL-2, и экспрессируется на Treg, активированных Th-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах [169]. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев количество активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) статистически значимо повышено относительно контрольных величин. При этом, максимальный уровень активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) в крови выявляется у пациентов с болезнью Грейвса и длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев. У пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев уровень активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$)

статистически значимо повышен, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Процентное содержание активированных цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) статистически значимо возрастает у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев. Однако, максимальный уровень активированных цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) в периферической крови выявлен у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев. Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев процентное число активированных цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) статистически значимо повышено, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Сохраняющиеся изменения в фенотипическом составе Т-лимфоцитов, несмотря на поддержание эутиреоидного состояния при лечении тиамазолом более 12 месяцев, которые были показаны в настоящем исследовании, позволяют утверждать, что высокий уровень активированных Th-клеток в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса может способствовать миграции Th1-клеток из периферической крови в пораженную щитовидную железу. Миграция Th-клеток в щитовидную железу приводит к усилению презентации тиреоидных антигенов, способствуя дальнейшей активации Т-клеточного иммунитета [105].

Таким образом, установленные закономерности в изменении фенотипического состава Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при стойком медикаментозном эутиреозе на фоне консервативной терапии свидетельствуют об иммуномодулирующих эффектах длительной терапии тиамазолом на систему адаптивного иммунитета и стимуляции регуляторного звена иммунной системы, направленной на супрессию аутоиммунного процесса.

Однако, установленный повышенный титр антител к рТТГ, значительное увеличение уровня антител к ТПО, а также выявленные изменения в увеличении

процентного числа активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+CD25^+$) у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев, при увеличении количества Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в крови свидетельствуют о тяжелом регуляторном дефекте Treg и значительном снижении их функции.

Полученные результаты позволяют выделить субпопуляцию Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) не только как мишень для этиотропной терапии регуляторного дефекта иммунной системы у пациентов с болезнью Грейвса, но и в качестве возможного маркера иммунологической ремиссии заболевания перед завершением курса длительной консервативной терапии тиамазолом.

На основании полученных данных можно заключить, что длительный медикаментозный эутиреоз, индуцируемый тиамазолом, способствует повышению доли Treg у пациентов с болезнью Грейвса, но не влияет на генерализованные нарушения их супрессорной функции, причем эти нарушения не зависят от гипер- или эутиреоидного состояния, титра антител к рТТГ и могут поддерживать, и усиливать аутоиммунный процесс, и становятся наиболее выраженными у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев.

Одной из задач исследования являлось создание информативного способа раннего и быстрого прогнозирования развития рецидива при планировании длительного консервативного лечения в дебюте болезни Грейвса.

Поставленная задача осуществлялась за счет того, что у больных после постановки диагноза болезни Грейвса с помощью метода проточной цитометрии определяли процентное содержание Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и активированных В1-лимфоцитов ($CD19^+CD5^+CD23^+$).

Затем вычисляли разработанный коэффициент В1-клеточной активации (В1КА), представляющий собой соотношение процентного содержания активированных В1-лимфоцитов к процентному содержанию общей фракции Т-лимфоцитов, $В1КА = \frac{\text{активированные В1-лимфоциты}}{\text{общая фракция Т-лимфоцитов}}$ (таблица 8, рисунок 7).

Таблица 8 – ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза рецидива болезни Грейвса при консервативном лечении

Коэффициент	AUC	Оптимальное значение	Чувствит., %	Специф., %	p
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ / CD3 ⁺	1	0,018	100	100	0,0001

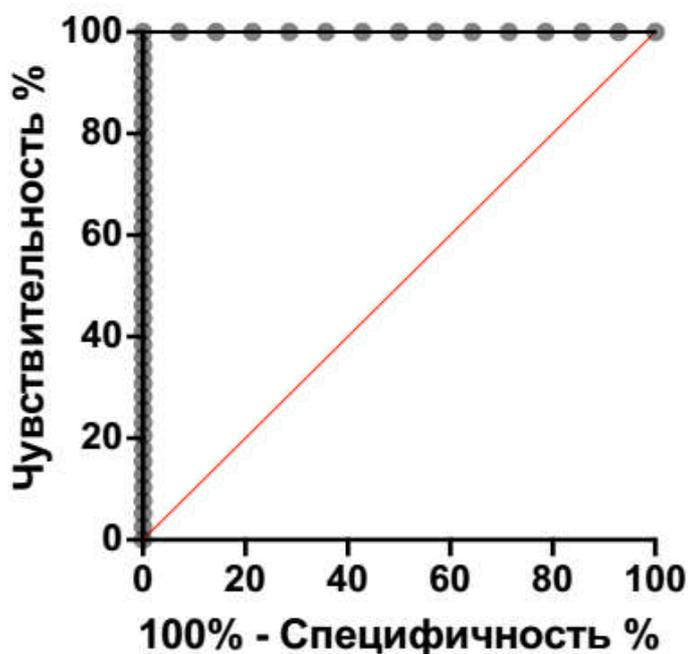


Рисунок 7 – ROC-кривая значения коэффициента В1КА и исхода консервативного лечения

При значении 0,018 и выше прогнозируют развитие рецидива при консервативном лечении пациентов с болезнью Грейвса, а при В1КА ниже 0,018 – развитие стойкой и длительной ремиссии. Значение 0,018 получено опытным путем на основании сопоставления значений рассчитываемого В1КА и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса. Значение В1КА равное или выше 0,018 свидетельствует об относительном увеличении количества активированных В1-лимфоцитов и повышении вероятности развития аутоагрессии на фоне консервативного лечения болезни Грейвса.

Способ прогноза реализуется следующим образом. У больных сразу после постановки диагноза болезни Грейвса забирают венозную кровь (для анализа достаточно 100 мкл) свободным током в пробирки с ЭДТА. Образец 100 мкл крови с ЭДТА помещают в пробирку для проточного цитофлуориметра, куда также помещают моноклональные антитела к рецепторам Т-лимфоцитов и активированных В1-лимфоцитов. Например, CD3-PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), CD19-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD5-PE (phycoerythrin) и CD23-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5). Пробирка помещается в темное место на 15 минут, после в нее добавляется 1 мл лизирующего раствора (например, VersaLyse (Beckman Coulter, США)) и затем снова помещается в темное место на 15 минут. Анализ прокрашенных клеток осуществляют на любом проточном цитофлуориметре (например, Navios (Beckman Coulter, USA)). Для повышения степени точности анализа необходимо проанализировать не менее 50000 лимфоцитов.

Затем рассчитывается коэффициент В1-клеточной активации (В1КА): В1КА = активированные В1-лимфоциты ($CD19^+CD5^+CD23^+$)/общая фракция Т-лимфоцитов ($CD3^+$). При значении 0,018 и выше прогнозируют развитие рецидива при длительном консервативном лечении пациентов с болезнью Грейвса, а при В1КА ниже 0,018 – развитие стойкой и длительной ремиссии.

Данный способ апробирован на 33 пациентах с болезнью Грейвса. По результатам обследования пациентов с болезнью Грейвса по заявленному способу установлено, что у 23 (70,00%) пациентов разовьется рецидив заболевания. У этих пациентов величина В1КА составила 0,018 – 0,285 (равное и выше 0,018).

У 10 (30,00%) пациентов прогнозировалось развитие ремиссии болезни Грейвса, величина В1КА у них составила 0,007 – 0,017. По результатам дальнейшего клинического наблюдения установлено совпадение прогноза в 100% случаев.

Таким образом, разработанный способ информативен, отвечает современным требованиям к методам клинико-лабораторной диагностики, позволяет осуществить прогноз рецидива у пациентов с болезнью Грейвса при планировании длительной консервативной терапии тиамазолом в дебюте заболевания и может быть рекомендован для применения в клинической практике.

4.2. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом

Выяснение иммунологических основ развития и рецидивирования аутоиммунного гипертиреоза Грейвса до сих пор остается предметом дискуссий и мало, что меняет в терапевтических подходах к этому заболеванию, а снижение уровня антител к рТТГ в сыворотке крови является единственным критерием эффективности лечения в клинической практике [282]. Несмотря на патогномичность данного критерия некоторые работы демонстрируют, что титр антител к рТТГ при манифестации гипертиреоза и спустя 12 месяцев терапии антитиреоидными препаратами не всегда является прогностически значимым маркером стойкого эутиреоза, и иммунологической ремиссии заболевания [30]. Окислительный стресс быстро усиливается после повышения уровня гормонов щитовидной железы в периферической крови, а гипертиреоз связан с окислительным повреждением липидов и геномной ДНК в стенке аорты, усилением экспрессии интратиреоидного антиоксидантного белка пероксиредоксина 5 (PRDX5), повышенной активностью глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в печени [74, 208].

Имеются противоречивые сообщения о том, что антитиреоидные препараты снижают уровень показателей окислительного стресса за счет восстановления эутиреоза и общего реактивного антиоксидантного потенциала плазмы [95]. С другой стороны, показано снижение общей антиоксидантной способности у пациентов со средней продолжительностью гипертиреоза $2,3 \pm 1,5$ месяца [192]. Но, до сих пор остается неизученной радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза и длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом, что представляется значимым в раскрытии механизмов рецидивирования заболевания.

В связи с этим, одной из задач исследования являлось изучение уровня продукции АФК в нейтрофилах периферической крови при разной длительности меди-

каментозного эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса, который оценивали с помощью метода хемилюминесценции.

Первоначально, на фоне гипертиреоза, и после достижения стабильного эутиреоза с помощью хемилюминесцентного анализа нейтрофилов периферической крови, с использованием усилителей свечения люцигенина и люминола у пациентов с болезнью Грейвса определяли, соответственно, уровень продукции первичных и вторичных АФК.

Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза представлены в таблице 9. Данные, полученные в ходе хемилюминесцентного анализа нейтрофилов крови с использованием люцигенина, у пациентов с болезнью Грейвса, в зависимости от продолжительности достигнутого медикаментозного эутиреоза, позволили установить, что суммарный синтез (S) в системем первичных АФК, в частности, супероксид-радикала, при спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо возрастал относительно контрольных значений у обследуемых пациентов при продолжительности эутиреоидного состояния 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

У пациентов с болезнью Грейвса при продолжительности медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев в пробах с люцегенином суммарный уровень продукции первичных АФК (S) соответствовал контролю, как спонтанной, так и зимозан-индуцированной хемилюминесценции, и статистически значимо уменьшался относительно значений, установленных у пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Также, при спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев отмечалось значительное снижение показателя максимального уровня синтеза (I_{max}) хемилюминесцентной реакции, как относительно контроля, так и показателей, установленных у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Таблица 9 – Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикаментозный эутиреоз 5 – 8 мес. n = 41 2	Медикаментозный эутиреоз 9 – 12 мес. n = 69 3	Медикаментозный эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	1741 (1398 – 2057)	1662 (1445 – 1911)	1666 (1383 – 2428)	1250 (1090 – 2079)
I _{max} , о.е. × 10 ³	10,15 (0,87 – 28,59)	5,74 (5,32 – 20,50)	5,30 (1,39 – 14,06)	0,70 (0,46 – 2,21) p _{1,2,3} < 0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	1,74 (1,03 – 3,71)	17,66 (7,13 – 60,52) p ₁ < 0,001	15,88 (12,23 – 31,26) p ₁ < 0,001	2,84 (1,76 – 8,93) p _{2,3} < 0,001

Продолжение таблицы 9

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикаментозный эутиреоз 5 – 8 мес. n=41 2	Медикаментозный эутиреоз 9 – 12 мес. n =69 3	Медикаментозный эутиреоз > 12 мес. n =25 4
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
Tmax, сек.	1275 (809 – 1768)	1108 (991 – 1242) p ₁ =0,005	1356 (969 – 1721)	1329 (1285 – 1836)
I _{max} , о.е. × 10 ³	12,78 (6,45 – 42,81)	15,98 (9,54 – 32,13)	9,28 (4,55 – 23,59)	2,69 (0,73 – 3,38) p _{1,2,3} < 0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31 (1,45 – 8,18)	35,80 (21,46 – 85,61) p ₁ <0,001	25,43 (18,18 – 77,29) p ₁ <0,001	7,54 (2,61 – 10,73) p _{2,3} < 0,001
Синд./ Спонт.	1,89 (0,99 – 3,22)	1,49 (1,02 – 3,41)	1,55 (0,93 – 2,52)	1,96 (1,08 – 3,78)

Примечание. p₁— статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂— статистически значимые различия с показателями пациентов 1 группы, p₃— статистически значимые различия с показателями пациентов 2 группы.

Однако, у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от длительности медикаментозного эутиреоза, показатель скорости образования первичных АФК (T_{max}) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов соответствовал значениям, выявляемым в контрольной группе. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса при стабильном медикаментозном эутиреозе в течении 5 – 8 и 9 – 12 месяцев статистически значимо возрастал показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, соответственно, в 10,8 и 7,6 раз относительно контрольных величин. При этом, у пациентов с болезнью Грейвса при длительности медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев происходило снижение скорости образования первичных АФК (T_{max}) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов. У пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев выявлено снижение показателя максимального уровня синтеза (I_{max}) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесцентной реакции нейтрофилов, как относительно контроля, так и показателей, установленных у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

Установлено, что индекс активации у пациентов с болезнью Грейвса в тестах с люцегенином не имел статистически значимых различий, как с показателями контрольной группы, так и между группами пациентов с болезнью Грейвса с разной продолжительностью медикаментозного эутиреоза.

Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, отражающие уровень генерации в системе вторичных АФК, у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза представлены в таблице 10.

Люминол-зависимая спонтанная хемилюминесценция нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев позволила установить повышение показателей максимального уровня синтеза (I_{max}) и суммарного синтеза (S) вторичных АФК относительно контроля.

Таблица 10 – Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикаментозный эутиреоз 5 – 8 мес. n = 41 2	Медикаментозный эутиреоз 9 – 12 мес. n = 69 3	Медикаментозный эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	987 (627 – 2174)	1519 (748 – 1744)	1144 (575 – 1809)	831 (213 – 2831)
I _{max} , о.е. × 10 ³	39,85 (7,73 – 66,61)	43,63 (34,83 – 68,43) p ₁ <0,001	22,89 (6,40 – 53,00) p _{1,2} <0,001	8,60 (2,59 – 15,64) p _{1,2,3} <0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	5,37 (3,08 – 13,45)	82,72 (51,24 – 254,80) p ₁ <0,001	55,27 (5,95 – 124,50) p _{1,2} <0,001	17,54 (7,40 – 31,16) p _{1,2,3} <0,001

Продолжение таблицы 10

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикаментозный эутиреоз 5 – 8 мес. n = 41 2	Медикаментозный эутиреоз 9 – 12 мес. n = 69 3	Медикаментозный эутиреоз > 12 мес. n = 25 4
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	912 (631 – 1188)	958 (764 – 1431)	977 (598 – 1511)	800 (558–1578)
I _{max} , о.е. × 10 ³	147,24 (17,75 – 247,37)	146,67 (106,35 – 152,95)	91,66 (26,83 – 139,95) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,031	21,02 (12,60 – 36,19) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,009
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	16,05 (6,59 – 35,74)	334,70 (165,24 – 769,00) p ₁ < 0,001	154,20 (136,80 – 373,60) p _{1,2} < 0,001	67,12 (27,03 – 80,96) p _{1,2,3} < 0,001
Синд./ Спонт.	2,26 (1,34 – 3,95)	2,97 (1,83 – 5,08) p ₁ = 0,049	2,41 (1,77 – 4,00)	3,31 (2,15 – 8,84) p ₁ = 0,009

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов 1 группы, p₃ — статистически значимые различия с показателями пациентов 2 группы.

Причем, показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев статистически значимо возрастал в 15,3 раз относительно значений, выявляемых в контрольной группе. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев показатель максимального уровня синтеза (Imax) люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов снижался в сравнении с величинами, установленными у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев и был статистически значимо ниже контрольных величин. В то же время, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев статистически значимо снижался показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов относительно значений, установленных у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев, но оставался в 10,2 раз вышеконтрольных величин.

В группе пациентов с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев максимальный уровень синтеза вторичных АФК люминол-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции соответствовал контролю, и снижался относительно показателей, установленных у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев показатель максимального уровня синтеза (Imax) вторичных АФК люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев. Однако, показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов больных с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев остается повышенным, в сравнении с контрольными величинами, но статистически значимо снижается относительно значений, выявляемых у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев.

При этом, у пациентов с болезнью Грейвса показатель скорости образования вторичных АФК (T_{max}) люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов соответствовал контрольным значениям и статистически значимо не изменялся в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза.

При люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев выявлено повышение в 20,8 раз показателя суммарного синтеза (S) вторичных АФК, но при соответствии показателей скорости образования (T_{max}) и максимального уровня синтеза (I_{max}) вторичных АФК контрольным величинам. У пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев установлено статистически значимое снижение показателя максимального уровня синтеза (I_{max}) люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев. Также, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 9 – 12 месяцев статистически значимо снижался показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов относительно значений, установленных у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев, но оставался в 9,6 раз выше контрольных величин.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев показатель максимального уровня синтеза (I_{max}) вторичных АФК люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается, как относительно контрольных величин, так значений, выявляемых при обследовании больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев. Однако, показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев остается повышенным, в сравнении с контрольными величинами, но статистически значимо сни-

жается относительно значений, выявляемых у больных с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев. При этом, у пациентов с болезнью Грейвса показатель скорости образования вторичных АФК (T_{max}) люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов соответствовал контрольным значениям и статистически значимо не изменяется в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза.

Индекс активации (Синд./ Спонт.) в пробах с люминолом статистически значимо возрастал относительно контроля у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 месяцев и более 12 месяцев, но соответствовал контрольным показателям у больных длительностью медикаментозного эутиреоз 9 – 12 месяцев.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев происходит более чем четырехкратное увеличение суммарного синтеза вторичных АФК при антигенной стимуляции нейтрофилов, но при повышении соотношения общего суммарного синтеза вторичных АФК (Синд./Спонт.), что доказывает сохранение метаболических резервов для функциональной активации клеток.

Корреляционный анализ позволил установить изменения характера взаимосвязей между показателями оксидативного стресса и тиреоидного статуса у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от продолжительности медикаментозного эутиреоза. При поддержании эутиреоидного состояния в течение 5–8 месяцев у пациентов выявляется отрицательная связь показателя максимального синтеза супероксидного аниона с уровнем ТТГ ($r = - 0,69$, $p = 0,008$) и свТ3 ($r = 0,56$, $p = 0,042$).

У пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 9– 12 месяцев установлены положительные взаимосвязи между скоростью развития хемилюминесцентной реакции и уровнем свТ3 ($r = 0,47$, $p = 0,008$), а также соотношением первичных и вторичных АФК, и уровнем ТТГ спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = 0,45$, $p = 0,021$).

У пациентов с продолжительностью эутиреоза более 12 месяцев установлена связь показателя скорости развития хемилюминесцентной реакции зимозан-

индуцированной люцегинин-зависимой хемилюминесценции с уровнем ТТГ ($r = 0,89$, $p = 0,006$) и свТ4 ($r = - 0,82$, $p = 0,023$). Только в группе пациентов с болезнью Грейвса с длительностью эутиреоидного состояния более 12 месяцев обнаружены отрицательные связи между титром антител к рТТГ и показателями I_{max} ($r = - 0,78$, $p = 0,036$) и S ($r = - 0,82$, $p = 0,021$) зимозан-индуцированной люцегинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов. Также, при стабильном эутиреоидном состоянии в течение более 12 месяцев были обнаружены взаимосвязи между показателями спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и уровнем гормонов щитовидной железы, соответственно, T_{max} и свТ3 ($r = - 0,78$, $p = 0,036$), I_{max} и свТ4 ($r = 0,82$, $p = 0,023$). Следует подчеркнуть, что выявленные взаимосвязи у пациентов с болезнью Грейвса появляются в зависимости от продолжительности медикаментозного эутиреоза и не определяются в группе контроля.

Полученные результаты позволяют заключить, что, несмотря на достигнутый стабильный медикаментозный эутиреоз длительностью 5 – 8 и 9 – 12 месяцев у пациентов с болезнью Грейвса наблюдается высокий базальный уровень продукции первичных АФК, в частности супероксидного аниона, который является ключевым фактором инициации каскада преобразований АФК [289]. Также, у пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев кислородозависимые метаболические системы нейтрофилов периферической крови неадекватно реагируют на дополнительную нагрузку опсонизированным зимозаном. При значительном увеличении суммарного уровня продукции супероксидных анионов, продуцированных клетками иммунной системы, возрастает и скорость развития хемилюминесцентной реакции зимозан-индуцированной люцегинин-зависимой хемилюминесценции. Следовательно, нейтрофилы крови пациентов с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев интенсивно синтезируют супероксид-радикал, что отражает значительное напряжение кислородного метаболизма.

Уменьшение интенсивности и суммарной продукции супероксидного аниона отмечается вместе с увеличением времени нахождения пациентов с болезнью Грейвса в эутиреоидном состоянии, что подтверждается соответствием динамики

наработки АФК нейтрофилами пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев и контрольной группы. Следовательно, при длительном эутиреоидном состоянии (более 12 месяцев) у пациентов с болезнью Грейвса происходит подавление АФК-продуцирующих систем клеток в начале цепи преобразования свободных радикалов, что на уровне клетки проявляется более стабильным уровнем выхода первичных АФК, а супероксидные радикалы проходят через мембрану в относительно постоянном объеме. Нормальное соотношение продукции первичных и вторичных АФК люцегинин-зависимой хемилюминесценции свидетельствует о сохраненных возможностях АФК-продуцирующих систем клеток на этапе суммарного эффекта образования свободных радикалов независимо от длительности медикаментозного эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса.

Можно предположить, что восстановление и длительное поддержание медикаментозного эутиреоза на фоне консервативной терапии тиамазолом у пациентов болезнью Грейвса снижает нагрузку системного окислительного стресса на иммунную систему. Также, полученные данные позволяют предположить, что достижение медикаментозного эутиреоза при лечении антитиреоидными препаратами несет в себе защитный механизм, направленный против интенсификации синтеза и циркуляции АФК, вызванного гиперпродукцией гормонов щитовидной железы.

Однако, результаты настоящего исследования, также, убедительно демонстрируют и то, что у пациентов с болезнью Грейвса, с продолжительностью медикаментозного эутиреоза 5 – 8 и 9 – 12 месяцев, наряду с повышенной продукцией супероксидного радикала в нейтрофилах, отмечается и активация биохимических процессов, результатом которых является интенсивная продукция вторичных АФК, в частности гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Но, в то же время, при длительности эутиреоидного состояния 9 – 12 месяцев в нагрузочных тестах с зимозаном люминол-зависимой хемилюминесценции наблюдается снижение интенсивности и суммарного синтеза вторичных АФК нейтрофилов.

При этом, у пациентов с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев максимальное значение интенсивности синтеза вторичных АФК

восстанавливается до уровня контрольной группы, как исходно, так и при дополнительной нагрузке зимозаном.

Таким образом, выявленная интенсификация базальной и стимулированной радикал-продуцирующей активности нейтрофилов пациентов с болезнью Грейвса при длительном медикаментозном эутиреозе (более 12 месяцев) может оказывать повреждающее действие, как на клетки иммунной системы, так и на тиреоциты, способствуя усугублению дефекта первичной иммунорегуляции Treg с последующей иммунной атакой, прогрессированием патологического процесса, и может являться одним из механизмов рецидивирования заболевания.

4.3. Уровень продукции АФК и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив)

Активная дисмутация свободных радикалов при гипертиреозе аутоиммунного генеза играет значительную роль в рецидивирующем течении болезни Грейвса, в то время, как развитие эутиреоза снижает избыточную экспрессию и гиперреактивность системы генерирующей H_2O_2 через ингибирование тиреоспецифических белков, принадлежащих к семейству НАДФ-оксидаз [286]. Механизмы стимуляции иммунной системы при манифестации и рецидиве гипертиреоза на фоне терапии антитиреоидными препаратами при болезни Грейвса до сих пор изучены не полностью [2, 69, 212]. У пациентов с болезнью Грейвса развивается стойкое аутоиммунное воспаление, эффективность которого определяет тяжесть течения, ответ на тиреостатическую терапию и рецидивирующее течение гипертиреоза [3, 53, 55]. Несмотря на органоспецифичность заболевания, все больше исследователей разделяют мнение, что неадекватный иммунный ответ против щитовидной железы при болезни Грейвса реализуется на разных уровнях и инициирует длительный аутоиммунный процесс [5, 204, 221].

Однако, до сих пор отсутствуют исследования уровня радикал-продуцирующей способности и активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ

нейтрофилов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза при консервативном лечении антитиреоидными препаратами, что представляется особенно значимым в клиническом аспекте поддержания аутоиммунного процесса при рецидиве заболевания. В связи с этим, был исследован уровень продукции АФК и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса с достигнутым, стойким медикаментозным эутиреозом и рецидивом гипертиреоза, на фоне непрерывной консервативной терапии тиамазолом. Группы пациентов с компенсированным (медикаментозный эутиреоз) и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив) были сформированы согласно критериям диагностики и протоколу консервативного лечения болезни Грейвса национальных клинических рекомендаций [14].

В проспективное исследование было включено 160 женщин с лабораторно подтвержденной болезнью Грейвса, в возрасте от 18 до 65 лет. Все пациенты наблюдались в Клинике эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» с дебюта заболевания. При верификации болезни Грейвса манифестный гипертиреоз диагностировали у 141 (88,00 %) и субклинический гипертиреоз – у 19 (12,00 %) пациентов, соответственно, ТТГ = 0,010 мЕд/л (0,003– 0,04), свТ3 = 7,43 пмоль/л (5,21 – 9,33), свТ4 = 21,52 пмоль/л (20,23 – 33,67) и ТТГ = 0,030 мЕд/л (0,004 – 0,012), свТ3 = 4,39 пмоль/л (2,33 – 5,51), свТ4 = 15,45 пмоль/л (10,83 – 17,65). Медианы уровня антител к рТТГ и ТПО у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не отличались в зависимости от степени тяжести гипертиреоза на момент манифестации заболевания и составили, соответственно, 15,61 МЕ/л (10,25 – 24,63) и 295,45 мЕд/л (51,27 – 543,24).

Всем пациентам сразу после верификации заболевания инициирована консервативная терапия тиамазолом по стандартному протоколу с последующим переводом на постоянный прием поддерживающей дозы тиреостатика. При клинико-гормональном обследовании через 6 недель после инициации консервативной терапии тиамазолом у всех пациентов с болезнью Грейвса диагностировался медикаментозный эутиреоз: ТТГ = 0,69 мЕд/л (0,45– 2,85), свТ3 = 4,81 пмоль/л (2,32 –

5,63), свТ4 = 12,64 пмоль/л (10,25 – 17,41). При последующем наблюдении и клинико-гормональном обследовании через три месяца от момента начала консервативной терапии тиамазолом, при приеме поддерживающей дозы тиреостатика, у 95 (59,00 %) пациентов с болезнью Грейвса определялся стойкий медикаментозный эутиреоз, у 65 (41,00 %) пациентов диагностирован рецидив гипертиреоза.

Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным (медикаментозный эутиреоз) и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив) представлена в таблице 11.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса несмотря на положительную динамику снижения циркулирующих антител к рТТГ при трехмесячном лечении тиамазолом, их титр оставался статически значимо повышен относительно контрольных значений, независимо от компенсации гипертиреоза. Похожие изменения у пациентов с болезнью Грейвса наблюдались и в уровне концентрации антител к микросомальной фракции тиреоцитов. У пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом выявлено статистически значимое увеличение титра антител к ТПО относительно контрольных величин.

Однако, у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом (рецидив) титр антител к рТТГ, и ТПО статистически значимо возрастал не только относительно контрольного диапазона, но и величин, выявляемых у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом. Следовательно, у пациентов с болезнью Грейвса оба тканевых антигена щитовидной железы (рТТГ и ТПО) принимают участие в развитии рецидива гипертиреоза.

Но, в то же время, установленное статистически значимое повышение титра антител к рТТГ и ТПО у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом, на фоне поддерживающей дозы тиамазола, вероятно, подтверждает инерционный механизм активации иммунной системы и каскадный процесс образования тиреоидспецифических антител даже при ликвидации гипертиреоза при консервативной терапии антитиреоидными препаратами.

Таблица 11 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза (Me, Q1– Q3)

Показатели	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса	
		Компенсированный гипертиреоз n = 95 2	Некомпенсированный гипертиреоз (рецидив) n = 65 3
Возраст, лет (M ± SD)	42,02 ± 12,03	42,02 ± 12,21	40,42 ± 13,12
Поддерживаю- щая доза тиамазола, мг	-	10,0 (10 – 15)	10,0 (10 – 15)
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	2,81 (1,59 – 3,67) p ₁ =0,001	0,11 (0,006 – 0,21) p _{1,2} < 0,001
свТ3, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	2,45 (1,75 – 3,11) p ₁ = 0,024	6,63 (4,81 – 8,42) p ₁ = 0,020 p ₂ = 0,010
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	15,23 (11,73 – 17,51) p ₁ = 0,023	21,61 (18,33 – 25,57) p _{1,2} <0,001
Антитела к рТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	3,25 (0,85 – 6,61) p ₁ = 0,030	7,51 (1,25 – 9,84) p _{1,2} < 0,001
Антитела к ТПО, мЕд/л	1,00 (0,00 – 3,00)	123,21 (23,01 – 325,12) p ₁ < 0,001	276,61 (93,22 – 421,43) p _{1,2} < 0,001
Объем щито- видной железы, мл	9,91 (9,41 – 12,63)	25,42 (19,46 – 32,21) p ₁ < 0,001	28,81 (21,43 – 45,63) p _{1,2} < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с компенсированным гипертиреозом.

При анализе клинико-гормональных показателей пациентов с болезнью Грейвса, в зависимости от компенсации гипертиреоза, обращает на себя внимание, что пациенты с компенсированным (медикаментозный эутиреоз) и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив) не различались по принимаемой поддерживающей дозе тиамазола.

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза представлена в таблице 12.

Оценка параметров люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови, отражающая активность НАДФН-оксидазы и уровень оксидативного стресса в системе первичных АФК, у пациентов с болезнью Грейвса позволила установить значительные отличия, как в сравнении с показателями контрольной группы, так и в зависимости от компенсации гипертиреоза.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом значительно возрастал показатель суммарной продукции первичных АФК (S) нейтрофилов относительно значений, выявляемых в контрольной группе. Причем, показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом статистически значимо возрастал, как относительно контрольных показателей, так и значений, установленных у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом. Похожая кинетика хемилюминесцентного ответа наблюдалась и при зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, в ходе которой установлено статистически значимое повышение показателя суммарной продукции (S) первичных АФК в 5,41 и 54,1 раз, соответственно, в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе и с показателем суммарного синтеза первичных АФК пациентов болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом. Однако, независимо от компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса снижен показатель скорости образования (Tmax) первичных АФК нейтрофилов при антигенном воздействии.

Таблица 12 – Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза (Me, Q1– Q3)

Показатели	Контроль		Компенсированный гипертиреоз		Некомпенсированный гипертиреоз (рецидив)	
	n = 85		n = 95		n = 65	
	1		2		3	
	Me	Q1– Q3	Me	Q1– Q3	Me	Q1– Q3
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1741	1398 – 2057	1745	1741 – 2298	1673	1441 – 2279
Imax, о.е. × 10 ³	10,15	0,87 – 28,59	5,76	2,45 – 15,51	7,33	2,42 – 18,42
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	1,74	1,03 – 3,71	12,72	11,45 – 51,79	88,72	37,21 – 206,33
			p ₁ = 0,003		p _{1,2} < 0,001	
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1275	809 – 1768	1112	710 – 1284	1115	801 – 1315
			p ₁ = 0,020		p ₁ < 0,001	
Imax, о.е. × 10 ³	12,78	6,45 – 42,81	11,34	3,27 – 15,33	14,81	6,21 – 23,57
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31	1,45 – 8,18	41,75	19,23 – 115,61	179,23	76,23 – 242,41
			p ₁ < 0,001		p _{1,2} < 0,001	
Синд./Спонт.	1,89	0,99 – 3,22	2,20	1,33 – 4,23	2,17	1,78 – 3,50

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с компенсированным гипертиреозом.

Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза представлена в таблице 13.

Оценка параметров люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса позволила установить значительные изменения в уровне синтеза вторичных АФК нейтрофилов, в зависимости от компенсации гипертиреоза. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом статистически значимо повышаются показатели скорости образования (T_{max}) и суммарного синтеза (S) вторичных АФК спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов. У пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом показатель скорости образования (T_{max}) вторичных АФК снижен, относительно значений, установленных у пациентов с компенсированным гипертиреозом.

Однако, у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом значительно повышен показатель суммарного синтеза (S) вторичных АФК спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, как в сравнении с контрольными величинами, так и с показателями больных с компенсированным гипертиреозом. Более того, у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом дополнительно, относительно контрольных величин и значений больных с компенсированным гипертиреозом выявлялось базальное повышение максимального уровня синтеза (I_{max}) вторичных АФК нейтрофилов.

Наиболее выраженные изменения кинетики хемилюминесцентного ответа нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза были установлены в ходе стимулированной зимозаном люминол-зависимой хемилюминесценции. При антигенной стимуляции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом обнаружено статистически значимое повышение максимального уровня синтеза (I_{max}) и суммарного синтеза (S) вторичных АФК зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции.

Таблица 13 – Люминол-зависимая хемиллюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза (Me, Q1– Q3)

Показатели	Контроль n = 85 1		Компенсированный гипертиреоз n = 95 2		Некомпенсированный гипертиреоз (рецидив) n = 65 3	
	Me	Q1– Q3	Me	Q1– Q3	Me	Q1– Q3
Спонтанная хемиллюминесценция						
T _{max} , сек.	987	627 – 2174	2021	1805 – 2142	1154	691 – 1725
			p ₁ = 0,003		p ₂ = 0,010	
I _{max} , о.е. × 10 ³	39,85	7,73 – 66,61	29,73	10,21 – 36,51	61,25	19,52 – 91,25
					p _{1,2} < 0,001	
S, о.е.× сек. × 10 ⁶	5,37	3,08 – 13,45	125,41	21,21 – 315,21	923,65	61,45 – 1851,00
			p ₁ < 0,001		p _{1,2} < 0,001	
Зимозан-индуцированная хемиллюминесценция						
T _{max} , сек.	912	631 – 1188	781	727 – 981	1336	822 – 1745
I _{max} , о.е. × 10 ³	147,24	17,75 – 247,37	281,45	76,81 – 369,91	272,42	72,98 – 361,23
			p ₁ = 0,011		p ₁ < 0,001	
S, о.е.× сек. × 10 ⁶	16,05	6,59 – 35,74	865,51	142,81 – 1649,00	2521,54	293,25 – 6341,51
			p ₁ < 0,001		p _{1,2} < 0,001	
Синд./Спонт.	2,26	1,34 – 3,95	4,25	2,21 – 4,82	2,31	1,25 – 3,95
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,030	

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — статистически значимые различия с показателями пациентов с компенсированным гипертиреозом.

Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом установлено более чем десятикратное увеличение суммарного синтеза вторичных АФК зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольных величин и трехкратное в сравнении с показателями больных с компенсированным гипертиреозом. Повышение показателя максимального уровня синтеза (I_{\max}) вторичных АФК зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов определяет увеличение индекса соотношения суммарного синтеза АФК в ходе спонтанной и индуцированной хемилюминесценции ($S_{\text{инд.}}/S_{\text{спонт.}}$), что свидетельствует о сохранных резервных способностях в генерации общего пула свободных радикалов в нейтрофилах у пациентов с компенсированным гипертиреозом. Однако, выявленное снижение индекса соотношения суммарного синтеза АФК ($S_{\text{инд.}}/S_{\text{спонт.}}$) в ходе зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом, в сравнении с показателями больных с компенсированным гипертиреозом, при антигенном воздействии на клетки с помощью опсонизированного зимозана, характеризует отсутствие метаболических резервов для функциональной активации нейтрофилов.

С помощью корреляционного анализа установлено, что независимо от варианта течения заболевания у пациентов с болезнью Грейвса уровень свТ4 положительно взаимосвязан с показателем базальной и стимулированной суммарной продукции первичных АФК(S): при компенсированном гипертиреозе – соответственно, $r = 0,65$, $p = 0,001$ и $r = 0,61$, $p = 0,010$; при некомпенсированном гипертиреозе – соответственно, $r = 0,76$, $p < 0,001$ и $r = 0,81$, $p < 0,001$. Только у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом обнаружена взаимосвязь между концентрацией свТ4 и показателем базального максимального уровня синтеза (I_{\max}) вторичных АФК ($r = 0,72$, $p = 0,010$). Следовательно, у пациентов с болезнью Грейвса при компенсированном гипертиреозе свТ4 взаимосвязан только с активностью НАДФН-оксидазы и генерацией первичных АФК, но при некомпенсированном гипертиреозе свТ4 связан с уровнем продукции, как первичных, так и вторичных кислородных радикалов.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса независимо от компенсации гипертиреоза активность НАДФН-оксидазного комплекса уже в состоянии относительного покоя нейтрофилов характеризуется, как повышенная. Причем, при дополнительной стимуляции клеток опсонизированным зимозаном остается повышенной, как у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом. Уменьшение скорости синтеза первичных АФК на фоне антигенной стимуляции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса характеризует наличие резервной способности метаболической системы клеток к повышению уровня продукции супероксид-радикала независимо от компенсации гипертиреоза. Установлено, что у пациентов с рецидивом заболевания антигенное воздействие на нейтрофилы периферической крови не только приводит к замедлению скорости образования АФК, но и еще к большему увеличению суммарного числа продуцируемых первичных и вторичных АФК, в сравнении с пациентами с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом. Следует подчеркнуть, что выявленная у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом более интенсивная, чем у пациентов с компенсированным гипертиреозом, продукция вторичных кислородных радикалов в нейтрофилах свидетельствует о высокой цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета в гипертиреодную фазу заболевания.

Можно заключить, что первичные АФК в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом в большом объеме поступают в реакции образования вторичных высокоэнергетических оксидантов, в отличие от кислородного метаболизма нейтрофилов пациентов с некомпенсированным гипертиреозом. Полученные результаты позволяют предположить, что у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом супероксидные радикалы не так активно используются для дальнейших каскадных преобразований кислородных метаболитов.

Кроме того, полученные результаты демонстрируют, что у пациентов с компенсированным гипертиреозом иммуномодулирующие эффекты тиамозола реализуются по двум механизмам: ликвидация тиреотоксикоза и ингибирование

образования первичных и вторичных свободных радикалов на фагоцитирующих клетках иммунной системы. Но, вероятно, ингибирующий эффект достижения эутиреоидного состояния при консервативной терапии тиамазолом выражен слабо, так как купирование гипертиреоза не сопровождается восстановлением параметров продукции АФК до контрольных значений.

Известно, что высокий уровень генерации свободных радикалов в нейтрофилах у пациентов с болезнью Грейвса определяется особенностями их внутриклеточного метаболизма [24].

Исследование уровней активности НАД-и НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза позволило установить выраженные изменения, как относительно контрольных значений, так и в зависимости от компенсации гипертиреоза при консервативной терапии тиамазолом.

Изучение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов показало, что независимо от степени компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса выявлен высокий уровень активности Г6ФДГ, а также шунтирующей реакции НАДФ-МДГ нейтрофилов (рисунок 8 а, б).

Следует подчеркнуть, что у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом активность Г6ФДГ и НАДФ-МДГ значительно возросла не только относительно контроля, но и ферментативных единиц активности, установленных в группе пациентов с компенсированным гипертиреозом.

Уровень активности Г6ФДГ нейтрофилов крови у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом Грейвса статистически значимо возрастает в 6,4 раз и 4,2 раза, соответственно, относительно контрольных значений и величин активности, установленных у пациентов компенсированным гипертиреозом.

Также, независимо от компенсации гипертиреоза в нейтрофилах периферической крови пациентов с болезнью Грейвса относительно контрольных величин повышена активность ферментов вспомогательных дегидрогеназных реакций, - НАДФ-ГДГ и НАДФ-ИЦДГ (рисунок 8 в, г).

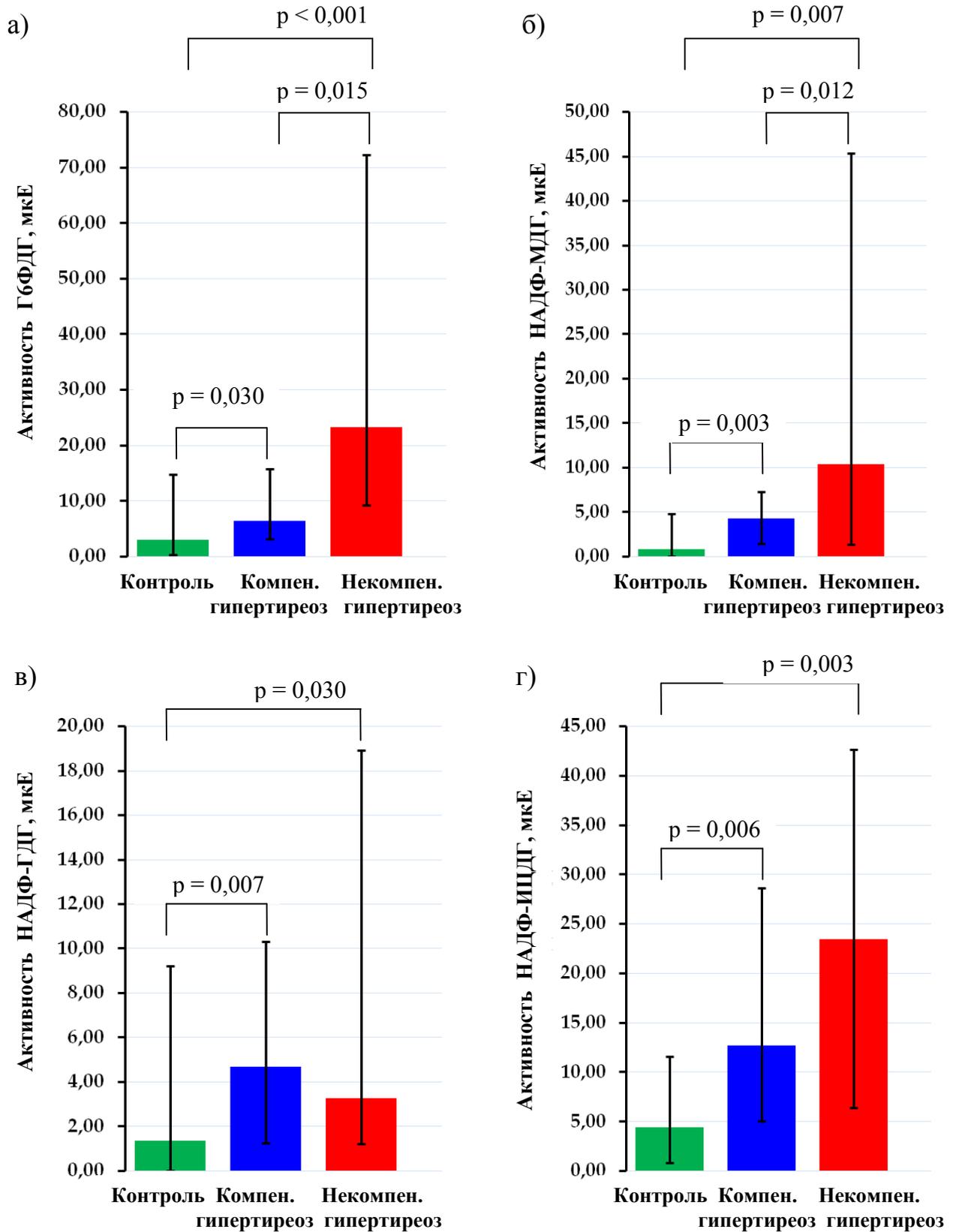


Рисунок 8 – Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом

Следует отметить, что Г6ФДГ является ключевым ферментом ПФЦ, основная функция которого – поддержание внутриклеточного уровня НАДФН и восстановленного глутатиона, выполняющего защитную функцию при усилении перекисного окисления, и цитотоксическом повреждении клеток [31].

В свою очередь, одним из механизмов функционального реагирования нейтрофилов является оксидативный стресс, реализация которого осуществляется через активацию ПФЦ [24, 253, 259]. Следовательно, у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом в нейтрофилах крови наблюдается гиперметаболическое состояние, с активацией гликолитических процессов и внутриклеточных механизмов свободно-радикального окисления, которые могут усиливать и поддерживать аутоиммунный процесс [230].

Уровень активности НАДФ-МДГ нейтрофилов периферической крови у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом статистически значимо возростал в 11,9 раз относительно контрольных величин и в 4,4 раза относительно значений, выявляемых у пациентов с болезнью Грейвса в состоянии компенсированного гипертиреоза.

Причем, уровень активности НАДФ-ИЦДГ в нейтрофилах периферической крови пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом статистически значимо возростал в 4,7 раз относительно ферментативных единиц активности, установленных в контрольной группе.

Известно, что НАДФ-ИЦДГ, катализируя вспомогательную реакцию ЦТК, присутствует и в митохондриях, и в цитоплазме, и становится значимой только в условиях высокой концентрации НАДН в митохондриальном компартменте клеток [88].

Выявленное у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом повышение активности НАДФ-ИЦДГ в митохондриальном компартменте нейтрофилов может свидетельствовать об адаптационных изменениях внутриклеточного метаболизма клеток врожденного иммунитета и активации антиапоптотических механизмов [3, 47, 90].

У пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом в нейтрофилах крови обнаружено повышение активности, в сравнении с показателями контрольной группы, всех исследуемых НАД-зависимых оксидоредуктаз - ГДГ и МДГ (рисунок 9 а, б). Повышение активности НАД-зависимых реакций МДГ и ГДГ отражает повышение аэробного дыхания и активности реакций аминокислотного обмена [31].

Сравнительный анализ уровней активности НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в зависимости от степени компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса позволил, также, отметить, что группы компенсированного и некомпенсированного гипертиреоза имели статистически значимые различия по уровню активности ЛДГ (рисунок 9 в).

Установлено, что активность аэробной реакции ЛДГ у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом статистически значимо возрастала в 2,2 раза и 3,9 раз, соответственно, относительно значений активности фермента, выявленных в контрольной группе, и в сравнении с показателями пациентов с компенсированным гипертиреозом.

При этом, у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом отмечалось статистически значимое снижение активности аэробной реакции ЛДГ нейтрофилов, в сравнении со значениями, выявляемыми в группе контроля. Выявленные закономерности изменения активности ЛДГ в зависимости от компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса доказывают, что высокая активность ЛДГ и, соответственно, нарушение тканевого дыхания нейтрофилов при некомпенсированном гипертиреозе являются сцепленными реакциями, которые могут играть существенную роль в механизмах рецидивирования заболевания.

У пациентов с болезнью Грейвса, как при компенсированном, так и при некомпенсированном гипертиреозе уровень активности НАД-ИЦД нейтрофилов статистически значимо не изменялся относительно значений, выявляемых в контрольной группе (рисунок 9 г).

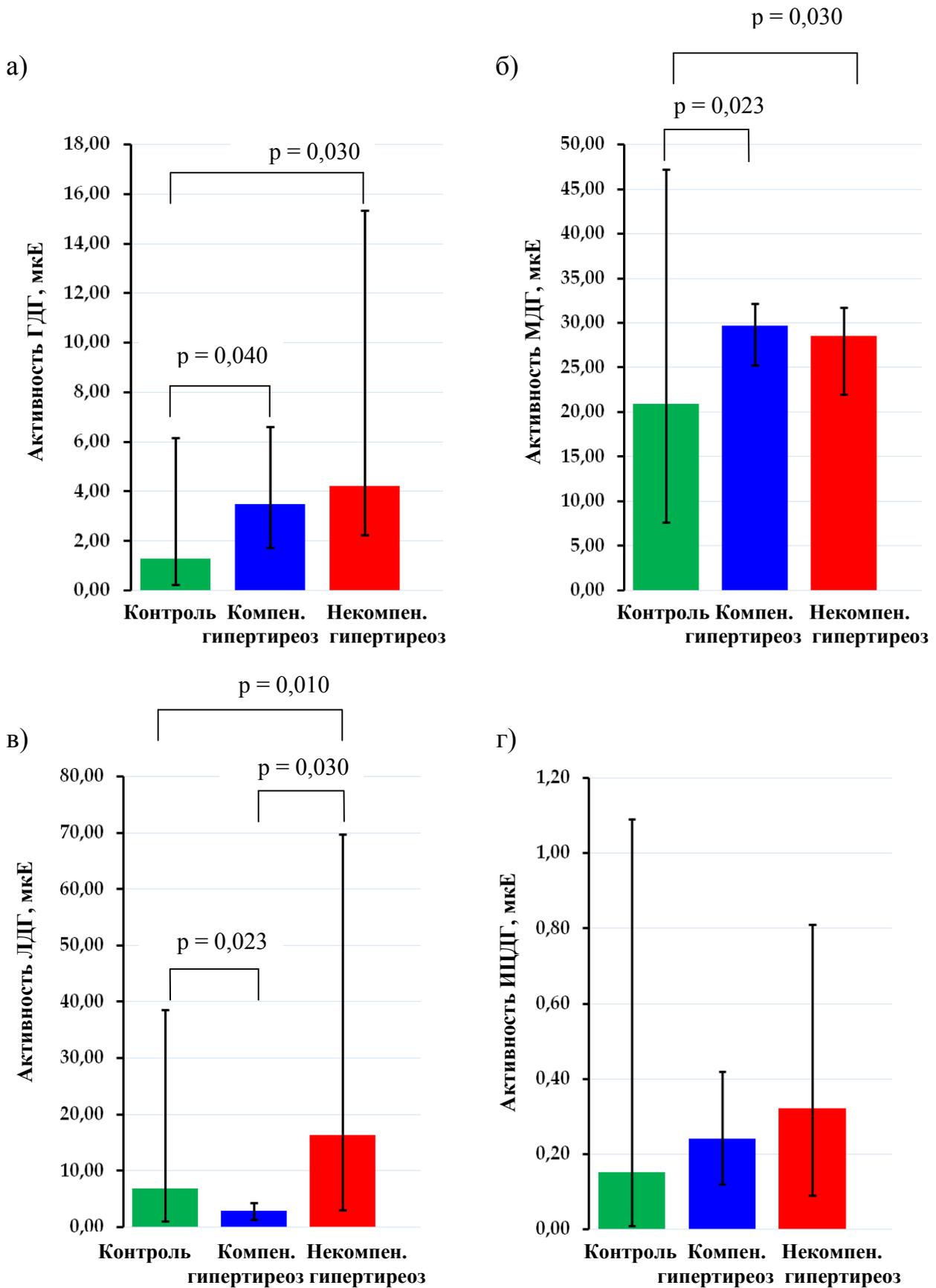


Рисунок 9 – Активность НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом

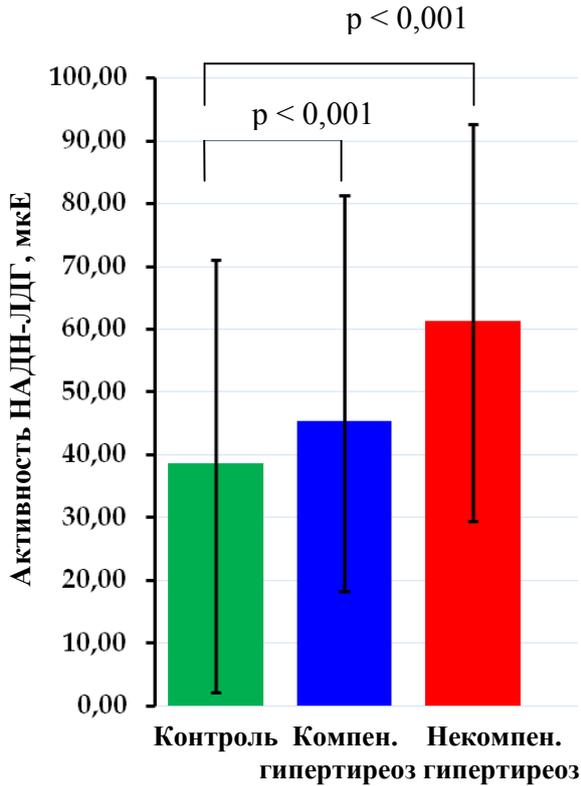
При исследовании НАДН-зависимых реакций нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса независимо от компенсации гипертиреоза установлена высокая активность НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ относительно контрольных величин (рисунок 10 а, б). Повышение активности НАДН-ЛДГ нейтрофилов крови пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом свидетельствует о высокой интенсивности субстратного потока по гликолизу [59]. Характерной особенностью пациентов с некомпенсированным гипертиреозом, также, было изменение активности НАДН-ГДГ (рисунок 10 в).

У пациентов с некомпенсированным гипертиреозом уровень активности НАДН-ГДГ статистически значимо возростал в 7,9 и 3,6 раз, соответственно, относительно контрольных величин и значений, выявляемых у пациентов с болезнью Гревса с компенсированным гипертиреозом.

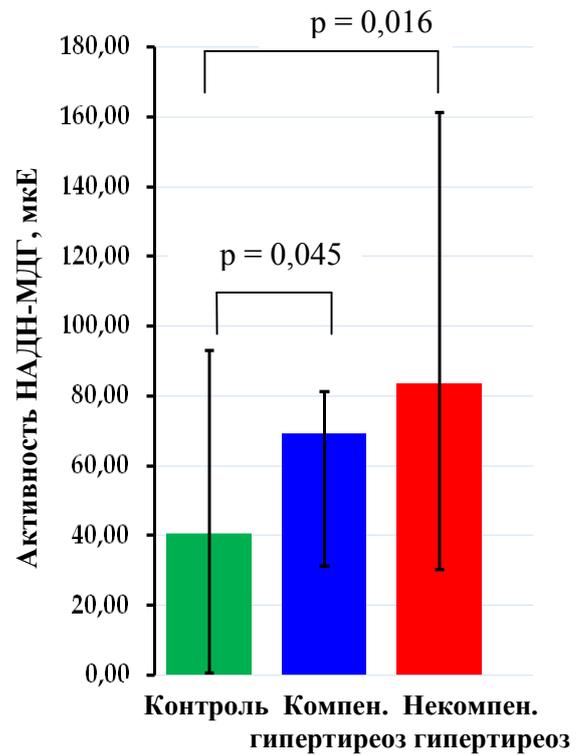
Выявленное повышение активности НАДН-ГДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом отражает интенсификацию реакции переноса продуктов аминокислотного обмена на ЦТК при рецидиве заболевания [31].

У пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом уровень активности НАДФН-ГДГ нейтрофилов статистически значимо не изменялся относительно значений, выявляемых в контрольной группе, а также между группами больных (рисунок 10 г). При этом, отсутствие компенсаторного повышения НАДФН-ГДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса свидетельствует о недостаточности механизмов, направленных на сохранение интенсивности субстратного потока по ЦТК [321]. Следует подчеркнуть, что нарушения внутриклеточного обмена глутамата оказывают влияние на функциональную активность клеток иммунной системы [178]. Следовательно, у пациентов с болезнью Грейвса, независимо от компенсации гипертиреоза отсутствие компенсаторного повышения активности НАДФН-ГДГ может быть связано с нарушением метаболизма глутамата и определять функциональную активность нейтрофилов, в том числе и в реализации аутоиммунного процесса при болезни Грейвса.

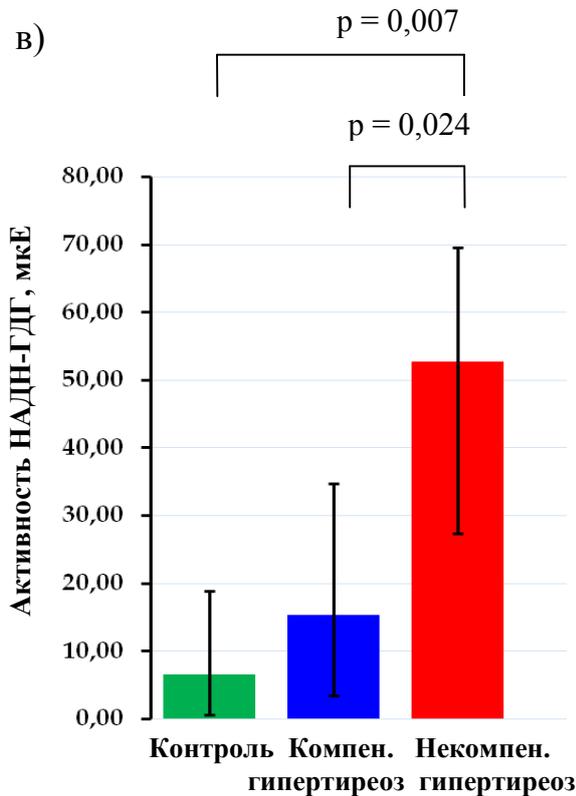
а)



б)



в)



г)

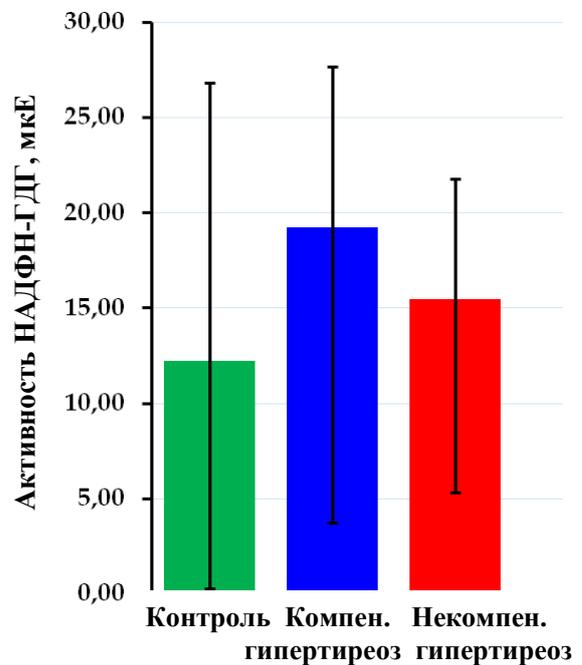


Рисунок 10 – Активность НАДН-и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом

Активность ГЗФДГ и ГР статистически значимо не изменяется ни в одной из групп пациентов с болезнью Грейвса (рисунок 11 а, б).

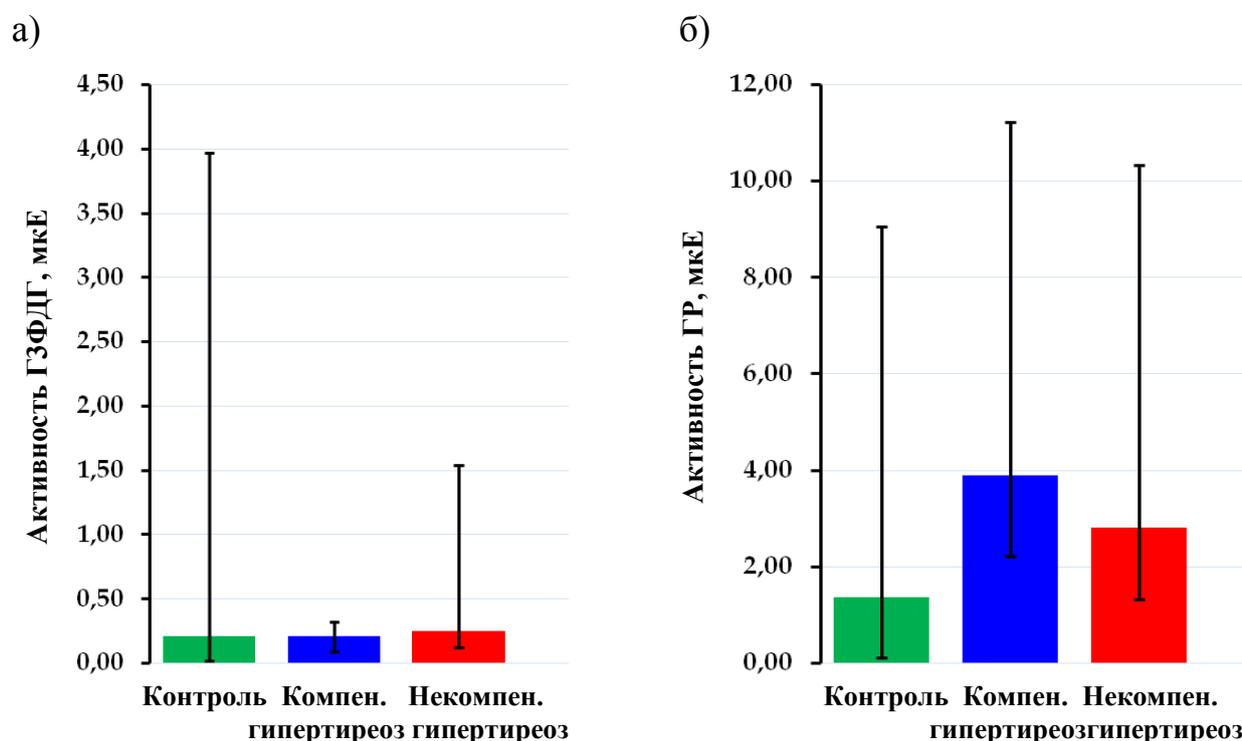


Рисунок 11 – Активность НАД-зависимой ГЗФДГ и ГР нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом

С помощью корреляционного анализа обнаружено, что у пациентов с болезнью Грейвса, как с компенсированным, так и с некомпенсированным гипертиреозом выявляются положительные корреляции свТ3 с уровнями активности ГбФДГ и НАДФ-МДГ в нейтрофилах: при компенсированном гипертиреозе – соответственно, $r = 0,69$, $p = 0,011$ и $r = 0,51$, $p = 0,030$; при некомпенсированном гипертиреозе – соответственно, $r = 0,79$, $p < 0,001$ и $r = 0,81$, $p = 0,020$. Только у пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом установлена положительная связь между уровнем свТ4 и внутриклеточной активностью МДГ ($r = 0,54$, $p < 0,001$).

У пациентов с болезнью Грейвса также выявляются взаимосвязи между активностью ферментов и показателями уровня продукции АФК в нейтрофилах.

У пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом установлена положительная корреляция активности Г6ФДГ с показателями интенсивности (I_{\max}) спонтанной и суммарной продукции (S) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемиллюминесценции ($r = 0,56$, $p = 0,010$ и $r = 0,64$, $p = 0,012$, соответственно).

У пациентов с болезнью Грейвса с некомпенсированным гипертиреозом выявлены положительные корреляции уровней активности Г6ФДГ и НАДФ-ГДГ с показателями суммарной продукции (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемиллюминесценции нейтрофилов ($r = 0,75$, $p < 0,001$ и $r = 0,81$, $p = 0,003$, соответственно) и интенсивности (I_{\max}) спонтанной люминол-зависимой хемиллюминесценции ($r = 0,79$, $p = 0,010$ и $r = 0,72$, $p = 0,002$, соответственно).

У лиц контрольной группы взаимосвязей между показателями тиреоидного статуса и показателями хемиллюминесцентной, и метаболической активности нейтрофилов, а также между показателями синтеза АФК и активностью ферментов в нейтрофилах не обнаружено.

Полученные результаты позволяют заключить, что в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса, независимо от компенсации гипертиреоза, выявляется повышение уровней активности МДГ, НАД-ГДГ и НАДН-МДГ, но уровень активности НАДН-ГДГ возрастает только при некомпенсированном гипертиреозе. Все указанные ферменты осуществляют регуляцию интенсивности субстратного потока по ЦТК. Причем, более высокая интенсивность обменных процессов в митохондриальном компартменте, за счет активации НАДН-ГДГ нейтрофилов, у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом свидетельствует об активации компенсаторных механизмов ингибирования перекисного окисления липидов в гипертиреоидную фазу болезни Грейвса. Необходимо отметить, что если у пациентов с болезнью Грейвса при компенсированном гипертиреозе свТЗ положительно взаимосвязан с активностью НАДФ-зависимых дегидрогеназ, то при некомпенсированном гипертиреозе тиреоидные гормоны положительно коррелируют с уровнями активности и НАД- и НАДФ-зависимых ферментов нейтрофилов.

Рассматривая выявленные негативные последствия накопления АФК в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса в состоянии длительного медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом, можно заключить, что оксидативный стресс, за счет активации перекисных процессов может играть существенную роль в разобщении важнейших внутриклеточных процессов нейтрофилов, функционировании НАДФН-оксидазного комплекса и может определять их функциональные возможности последующем развитии аутоиммунной реакции при болезни Грейвса.

Таким образом, установленные закономерности образования АФК при разной длительности медикаментозного эутиреоза и уровень активности важнейших окислительно-восстановительных ферментов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза при терапии тиамазолом существенно дополняют иммунопатогенетическую концепцию адаптации нейтрофилов к системным изменениям тиреоидного статуса и позволяют отнести генерацию АФК к самостоятельному механизму, поддерживающему аутоиммунную реакцию при развитии рецидива болезни Грейвса.

ГЛАВА 5. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ОЦЕНКОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

В аутоиммунный процесс при болезни Грейвса вовлекаются все компоненты паренхимы щитовидной железы [4, 36, 121]. Тиреоциты, экспрессируя молекулы HLA и презентирова антиген непосредственно Т-клеткам, могут инициировать аутоиммунное заболевание щитовидной железы, после воздействия какого-либо внешнего стимула [5, 117, 134]. Аккумуляция Т-клеток в паренхиме щитовидной железы при болезни Грейвса сильно рестриктирована, что может свидетельствовать о первичной роли Т-клеток в развитии гипертиреоза аутоиммунного генеза [27, 34, 52]. Инфильтрация щитовидной железы Th1-лимфоцитами ведет к развитию иммунного ответа по клеточному типу, который играет решающую роль в развитии интратиреоидного аутоиммунного воспаления. Постоянная стимуляция тиреоцитов активированными Th1-клетками может инициировать и поддерживать хроническое аутоиммунное воспаление с формированием провоспалительной петли регуляции обратной связи на уровне щитовидной железы [5].

Интратиреоидный Th1/Th2 баланс при болезни Грейвса связан с формированием пула Treg клеток, поддержанием их количества и степени активации, а также обратной связью между Treg и активированными Th-клетками [280]. Аутоиммунное воспаление при болезни Грейвса меняет морфологическую структуру щитовидной железы и представляет собой результат интегрированных взаимодействий лимфоцитов, мигрировавших непосредственно в ткань железы, и инфильтрировавших ее, с тиреоцитами, которые приобрели способность аберрантно экспрессировать широкий спектр цитокинов и молекул клеточной адгезии, HLA I и II класса [8, 10, 203].

Помимо доказательства важности органоспецифического участия системы Th1/Th2, а также провоспалительных цитокинов и хемокинов в патогенезе болезни

Грейвса, внимание исследователей в последние годы привлекает влияние длительной консервативной терапии антитиреоидными препаратами на субпопуляционный состав лимфоцитов, инфильтрирующих ткань щитовидной железы [163]. Длительное консервативное лечение тиамазолом при болезни Грейвса играет принципиальную роль в индукции медикаментозного эутиреоза и модуляции интратиреоидного и системного аутоиммунного процесса [73, 220, 341]. Тиамазол прерывает синтез тиреоидных гормонов и может оказывать иммуносупрессивный эффект, избирательно накапливаясь в щитовидной железе, где напрямую оказывает лечебное воздействие и подвергается первичному метаболизму, а значит, влияет и на клиническое течение заболевания [1, 7, 56].

Учитывая незначительное количество исследований относительно влияний длительной терапии тиамазолом на состояние интратиреоидного аутоиммунитета, а также участия в этом процессе клеток иммунной системы и тиреоцитов, задача данного раздела работы заключалась в выявлении возможных иммуномодулирующих эффектов тиамазола на фенотипический состав лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу, определение которых представляется наиболее важным с точки зрения разработки прогностических иммунологических критериев исхода длительной консервативной терапии и поможет создать специфический, целенаправленный подход, представляющий собой новую возможность в достижении иммунологической ремиссии заболевания

В то же время у пациентов с болезнью Грейвса остается неизученным количественный состав Treg, как в крови, так и в ткани щитовидной железы, и отсутствуют исследования их регуляторной функции после тиреоидэктомии и снижении антигенной нагрузки на иммунную систему больных. В связи с этим, проведено исследование фенотипического состава интратиреоидных лимфоцитов, в том числе, в сравнительном аспекте с фенотипическим составом лимфоцитов периферической крови, а также динамики ключевых иммунологических показателей пациентов с болезнью Грейвса после эпифасциальной тиреоидэктомии, длительно получающих тиамазол.

5.1. Клиническая характеристика и отбор пациентов с болезнью Грейвса на оперативное лечение

Отбор пациентов на оперативное лечение проводился согласно критериям стратификации лечебной тактики, установленным национальными клиническими рекомендациями по ведению пациентов с болезнью Грейвса. Для всех пациентов эпифасциальная тиреоидэктомия являлась терапией второй линии, после инициации консервативного лечения тиамазолом. В исследование включено 120 пациентов, из них 102 (85,00%) с рецидивирующим течением заболевания и 18 (15,00 %) пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса. У 6 (33,00 %) пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса показанием для оперативного лечения был большой объем щитовидной железы (более 40 мл), у 12 (67,00 %) пациентов с впервые выявленным заболеванием отмечалось сочетание нескольких факторов: большой объем щитовидной железы, сохраняющийся высокий титр антител к рТТГ на фоне нормализации уровня тиреоидных гормонов, предпочтение пациента, а также факт планирования беременности в ближайшие 12 месяцев.

Предоперационная клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от варианта течения заболевания представлена в таблице 14. Максимальная продолжительность приема тиамазола у пациентов с рецидивом болезни Грейвса составила 24 месяца. При этом, у 73 (72,00 %) пациентов рецидив гипертиреоза развивался в течение первых 3-4-х месяцев от момента перехода на поддерживающую дозу тиамазола, а у 29 (28,00 %) спустя 9-12 месяцев от начала консервативной терапии. Следует подчеркнуть, что при большей продолжительности непрерывного приема тиамазола в группе пациентов с рецидивом болезни Грейвса статистически значимых различий по уровню антител к рТТГ в сравнении с показателями пациентов с впервые выявленным заболеванием установлено не было. Однако, у пациентов с рецидивирующим течением заболевания выявлялся более низкий титр антител к ТПО, в сравнении с показателями пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, что отражает их меньшую значимость в реактивации аутоиммунного процесса и развитии рецидива.

Таблица 14 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от варианта течения заболевания перед оперативным лечением (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Впервые выявленная болезнь Грейвса n = 18	Рецидив болезни Грейвса n = 102	p
Возраст, лет (M ± SD)	44,46 ± 14,02	41,86 ± 11,99	-
Продолжительность приема тиамазола (с момента выявления заболевания), мес.	2,0 (1,0 – 4,0)	10,0 (7,0 – 12,0)	0,001
Поддерживающая доза тиамазола, мг	10,0 (10 – 15)	10,0 (10 – 15)	-
Объем щитовидной железы, мл	21,90 (18,8 – 48,75)	45,61 (27,12 – 84,35)	<0,001
ТТГ, мЕд/л	0,25 (0,12– 0,49)	2,54 (1,38 – 3,51)	<0,001
свТ3, пмоль/л	3,70 (2,71 – 5,02)	4,22 (3,66 – 5,41)	-
свТ4, пмоль/л	14,81 (11,61 – 16,01)	15,65 (11,87 – 17,32)	-
антитела к рТТГ, мЕд/л	10,81 (6,21 – 31,28)	9,82 (8,32 – 21,02)	-
антитела к ТПО, мЕд/л	223,13 (191,21 – 374,16)	51,34 (21,27 – 402,21)	0,002

Примечание. p— статистически значимые различия с показателями пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.

Однако, концентрация антител к микросомальному антигену тиреоцитов у пациентов с рецидивирующим течением болезни Грейвса была значительно ниже, чем у пациентов с впервые выявленным заболеванием.

Всем пациентам с болезнью Грейвса проводилась пальпация и УЗИ щитовидной железы с цветным доплеровским картированием. Пальпаторно щитовидная железа у обследуемых пациентов характеризовалась диффузным увеличением: 1 степени - у 41 (34,00 %) пациентов и 2 степени - у 79 (66,00 %). При пальпации закономерно отмечалась тугоэластичная консистенция железы, подвижность при глотании, отсутствие пальпируемых узловых образований, болезненности и спаянности с окружающей тканью. Ультрасонографическая картина у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса характеризовалась диффузным чередованием участков повышенной и пониженной эхогенности без четких контуров, а также умеренным снижением кровотока в ткани железы, что объяснялось развитием медикаментозного эутиреоза, индуцированного тиамазолом. У пациентов с рецидивом заболевания, в сравнении с группой пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, сонографическая картина, также, соответствовала критериям аутоиммунного поражения щитовидной железы, но выявлялся больший объем щитовидной железы с максимальным показателем – 137,81 мл, а при цветовом доплеровском картировании кровотока в строме был диффузно снижен, что может объясняться более длительным периодом консервативной терапии тиамазолом.

На момент оперативного лечения, как пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса, так и с рецидивом заболевания находились в состоянии достигнутого медикаментозного эутиреоза. При оценке клинико-гормональных показателей пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и с рецидивом заболевания в динамике после оперативного лечения статистически значимых различий получено не было. В связи с этим, клинико-гормональная характеристика обследуемых пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения изучалась независимо от клинического варианта течения заболевания.

Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (n = 120)			
		До операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
		1	2	3	4
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	2,51 (1,56 – 3,51) p ₁ < 0,001	2,52 (1,35 – 3,47) p ₁ < 0,001	2,32 (1,41 – 3,35) p ₁ < 0,001	2,43 (1,31 – 3,89) p ₁ < 0,001
свТЗ, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	4,22 (2,66 – 5,02)	3,81 (2,78 – 4,92)	3,71 (3,01 – 4,91)	4,35 (3,31 – 4,91)
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	14,25 (11,72 – 16,01)	15,68 (12,17 – 17,64)	15,12 (12,21 – 17,91)	14,65 (13,21 – 17,23)
антитела к рТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	14,87 (9,38 – 21,02) p ₁ < 0,001	3,43 (0,79 – 5,61) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,003	0,91 (0,69 – 1,51) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,005	0,82 (0,63 – 0,94) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,003
антитела к ТПО, мЕд/л	1,00 (0,00 – 3,00)	96,51 (49,01 – 322,51) p ₁ < 0,001	47,21 (21,02 – 72,25) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,004	25,01 (16,21 – 33,27) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,003	9,61 (6,03 – 14,32) p _{1,2,3} < 0,001 p ₄ = 0,002

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

При оценке клинико-гормональных показателей у пациентов с болезнью Грейвса обращает на себя внимание, что, как до, так и в динамике после оперативного лечения, титр антител к рТТГ был выше контрольных показателей.

При этом, если до оперативного лечения, высокий титр антител к рТТГ определялся на фоне стойкого, достигнутого медикаментозного эутиреоза, то после тиреоидэктомии в условиях компенсированного послеоперационного гипотиреоза. Несмотря на статистически значимое снижение титра антител к рТТГ в динамике оперативного лечения, их уровень через 3 и 6 месяцев не различался между собой и оставался высоким относительно контрольных показателей через пол года после тиреоидэктомии.

Аналогичным образом изменялась и концентрация антител к ТПО у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения. При обследовании до операции, несмотря на достигнутый медикаментозный эутиреоз, титр антител к микросомальной фракции тиреоцитов оставался высоким относительно контрольных значений, далее прогрессивно снижался при каждом последующем визите, но оставался повышенным через 6 месяцев после оперативного лечения в сравнении с величинами титра антител к ТПО, выявляемыми в контрольной группе. Полученные данные согласуются с утверждением о том, что антитела к микросомальному антигену тиреоцитов при аутоиммунных тиреопатиях не являются строго специфичными и могут отражать, как системный аутоиммунный процесс, так и выполнять защитную функцию при некоторых заболеваниях [247, 257, 365].

Таким образом, повышенный титр антител к рТТГ при длительном консервативном лечении тиамазолом, а также в динамике после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса подтверждает ключевую роль рТТГ, как специфического антигена заболевания. Сохраняющийся повышенным титр антител к ТПО у пациентов с болезнью Грейвса на протяжении всего периода наблюдения в динамике после оперативного лечения позволяет предположить, что положительные антитела к микросомальной фракции тиреоцитов являются чувствительным маркером иммунотиреоидной дисфункции и перенесенной органоспецифической иммунной атаки.

5.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Традиционно считается, что тиреоидэктомия при болезни Грейвса является радикальным методом лечения, так как устраняет орган-мишень и главный интра-тиреоидный антиген заболевания – рТТГ, и вызывает развитие стойкого гипотиреоза, но не влияет на нарушенную регуляторную функцию Treg, дефект которых лежит в основе иммунологической толерантности при гипертиреозе Грейвса [105, 136, 167]. Следовательно, идентификация отдельных дефектных субпопуляций Treg поможет создать специфический, целенаправленный подход в лечении болезни Грейвса, представляющий собой новую возможность не только в достижении иммунологической ремиссии заболевания, но и в восстановлении эутиреоза, без необходимости пожизненной терапии левотироксином [363]. В связи с этим, задачей настоящего этапа исследования являлось изучить фенотипический состав основных субпопуляций клеток иммунной системы в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения.

Содержание Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлено в таблице 16. Как показывают полученные данные у пациентов с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза, до оперативного лечения, статистически значимо снижено общее процентное число Т-лимфоцитов ($CD3^+$), при соответствии их абсолютного уровня контрольным значениям.

Установлено что, у пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения снижение относительное число Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) относительно контрольных величин, что свидетельствует об ингибировании аутоиммунного процесса, и может отражать иммуномодулирующие эффекты консервативной терапии тиамазолом.

Таблица 16 – Содержание CD3⁺-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,01 (1,68 – 2,33)	2,22 (1,71 – 2,84)	2,11 (1,61 – 2,65)	2,12 (1,63 – 2,42)	2,21 (1,61 – 2,72)
CD3 ⁺ , %	73,81 (68,01 – 77,83)	65,82 (57,42 – 75,42) p ₁ = 0,001	76,25 (71,05 – 81,73) p ₁ = 0,002 p ₂ = 0,011	76,76 (73,72 – 78,97) p ₁ = 0,041 p ₂ = 0,001	72,27 (68,62 – 77,26) p ₁ = 0,041 p ₂ = 0,010
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	2,01 (1,68 – 2,32)	1,35 (1,01 – 2,01)	1,44 (1,07 – 1,81)	1,52 (1,44 – 1,79)	1,31 (1,14 – 1,78)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,72 (37,81 – 48,01)	39,65 (29,78 – 48,91) p ₁ = 0,021	50,47 (39,92 – 55,21) p ₁ = 0,034 p ₂ = 0,012	47,13 (43,13 – 48,73)	50,77 (36,39 – 53,44) p ₁ = 0,021 p ₂ = 0,010

Продолжение таблицы 16

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 117			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	28,71 (23,72 – 34,32)	22,05 (19,69 – 28,51) p ₁ < 0,001	21,81 (16,92 – 27,91)	25,47 (23,39 – 28,85)	20,45 (12,13 – 21,34) p ₁ = 0,010
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,43 (1,04 – 1,95)	1,27 (0,85 – 1,85)	0,14 (0,11 – 0,16)	1,25 (0,34 – 1,43)	1,83 (1,22 – 2,71)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	0,38 (0,32 – 0,85)	0,41 (0,24 – 0,69)	0,48 (0,29 – 0,81)	0,27 (0,16 – 0,44)	0,31 (0,13 – 0,38)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ , %	0,41 (0,35 – 0,96)	2,92 (2,64 – 3,89)	2,14 (2,09 – 2,18)	1,23 (1,06 – 2,13)	2,21 (1,61 – 4,61)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Через 1 месяц после тиреоидэктомии и устранения антигенного стимула у пациентов с болезнью Грейвса возрастает процентное число общей фракции Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и Th-клеток ($CD3^+CD4^+$), как относительно контрольных величин, так и показателей, установленных до операции. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после операции общее процентное число Т-лимфоцитов ($CD3^+$) остается практически на таком же уровне, как и через 1 месяц после оперативного лечения, при соответствии Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) контрольным значениям. Через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса восстанавливаются практически все субпопуляции Т-лимфоцитов в периферической крови, но статистически значимо снижается относительно контрольных значений процентное число Т-клеток ($CD3^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$). Однако, через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса выявляется статистически значимо повышенный процентный уровень общей фракции Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) относительно контрольного диапазона и значений, установленных до операции. Восстановление большинства субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD3^+$) через 6 месяцев после тиреоидэктомии доказывает органоспецифичный генез развития иммунологической толерантности у пациентов с болезнью Грейвса и отражает развитие иммуносупрессивного состояния, связанного с устранением тиреоидспецифической антигенной стимуляции.

Содержание Treg в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлено в таблице 17. При изучении субпопуляционного состава Treg у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения были установлены статистически значимые изменения, как относительно контрольных показателей, так и в зависимости от сроков наблюдения в послеоперационном периоде. У пациентов с болезнью Грейвса при обследовании в состоянии медикаментозного эутиреоза, до операции, выявлено снижение абсолютного уровня Treg, а также процентного числа наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^+CD62L^+$) Treg, при соответствии остальных субпопуляций Treg контрольным величинам.

Таблица 17 – Содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , 10 ⁹ /л	0,06 (0,05 – 0,12)	0,04 (0,01 – 0,09) p ₁ = 0,010	0,04 (0,02 – 0,07) p ₁ = 0,011	0,05 (0,01 – 0,09)	0,014 (0,009 – 0,02) p ₁ < 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	1,55 (0,83 – 3,09)	1,93 (1,06 – 3,61)	1,77 (1,03 – 3,51)	2,62 (0,92 – 3,81) p ₁ = 0,011	0,87 (0,62 – 1,25) p _{1,2,3} < 0,001 p ₄ = 0,021
Treg CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	0,36 (0,26 – 0,69)	0,07 (0,01 – 0,09) p ₁ < 0,001	0,03 (0,01 – 0,05) p ₁ < 0,001	0,05 (0,02 – 0,07) p ₁ = 0,010	0,005 (0,003 – 0,008) p _{1,2,3,4} < 0,001

Продолжение таблицы 17

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
Treg CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	0,61 (0,32 – 0,89)	0,31 (0,27 – 0,66)	0,71 (0,66 – 0,73)	0,81 (0,67 – 0,91)	0,52 (0,39 – 0,63)
Treg CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	0,41 (0,21 – 0,55)	0,27 (0,11 – 0,61)	0,55 (0,29 – 0,73)	0,61 (0,32 – 0,83)	0,21 (0,13 – 0,49)
Treg CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	0,14 (0,12 – 0,21)	0,003 (0,001 – 0,006) p ₁ < 0,001	0,003 (0,002 – 0,009) p ₁ = 0,041	0,006 (0,004 – 0,01) p ₁ < 0,001	0,004 (0,002 – 0,010) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса уровень Treg центральной ($CD45R0^+CD62L^+$) и эффекторной ($CD45R0^+CD62L^-$) памяти соответствует контрольным величинам до операции и статистически значимо не изменяется в динамике после оперативного лечения. Через 1 месяц после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса абсолютный уровень Treg, а также процентное содержание наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg остается на том же уровне, что и до операции, и определяется статистически значимо низким в сравнении с контрольными величинами.

Через 3 месяца после операции у пациентов с болезнью Грейвса установлено транзитное восстановление абсолютного уровня Treg при увеличении процентного числа Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в сравнении с величинами, выявляемыми в группе контроля, но при сохранении низкого процентного содержания наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg. Однако, через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса процентное число Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) статистически значимо снижено, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после оперативного лечения.

Через 6 месяцев после операции в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса выявлен низкий абсолютный и процентный уровень Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), а также наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg, при соответствии Treg центральной ($CD45R0^+CD62L^+$) и эффекторной ($CD45R0^+CD62L^-$) памяти контрольным величинам. Причем, через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса процентное число наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg статистически значимо снижено, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после оперативного лечения. Снижение процентное числа наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после операции в сравнении с их уровнем, установленным

до оперативного лечения может являться, как проявлением количественном дефекта Treg, так и свидетельствовать о развитии иммуносупрессивного состояния, вследствие устранения органа-мишени. Можно предположить, что снижение процентного числа и, следовательно, функции циркулирующих в периферической крови больных общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg тесно связано с первичным дефектом иммунологической толерантности и играет ключевую роль в развитии и последующем поддержании аутоиммунного процесса при болезни Грейвса.

Содержание Th-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлено в таблице 18.

При изучении фенотипического состава Th-клеток у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения было установлено, что большинство исследуемых фракций Th-клеток в послеоперационном периоде соответствуют контрольным значениям. В то же время, у обследуемых больных до операции, в состоянии медикаментозного эутиреоза, наблюдалось снижение процентного числа наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Th-клеток при соответствии относительного количества Th-клеток центральной ($CD45R0^+CD62L^+$) и эффекторной ($CD45R0^+CD62L^-$) памяти, а также терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Th-клеток контрольным величинам.

Однако, через 1 месяц после оперативного лечения в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса происходило транзитное увеличение наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Th-клеток, при снижении Th-клеток центральной памяти ($CD45R0^+CD62L^+$) в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе.

Через 3 месяца после операции у пациентов с болезнью Грейвса установлено изолированное снижение процентного числа Th-клеток эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) относительно контрольных показателей, которое сохранялось и через 6 месяцев после тиреоидэктомии.

Таблица 18 – Содержание Th-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,96 (0,82 – 1,18)	0,93 (0,76 – 1,13)	0,95 (0,81 – 1,16)	0,94 (0,78 – 1,15)	0,97 (0,84 – 1,19)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	15,21 (11,83 – 21,61)	11,96 (6,31 – 14,32)	25,89 (23,24 – 29,36) p ₁ = 0,018 p ₂ < 0,001	21,32 (16,61 – 27,41)	18,26 (14,99 – 22,27)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	12,32 (10,81 – 14,51)	10,73 (8,98 – 13,69)	1,28 (1,07 – 1,47) p _{1,2} < 0,001	9,21 (7,23 – 16,75) p ₃ < 0,001	13,49 (10,77 – 17,75) p ₃ < 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	10,02 (8,52 – 13,42)	7,14 (6,12 – 10,48)	4,46 (3,26 – 4,53) p ₁ < 0,001	5,21 (4,43 – 7,21) p ₁ < 0,001	5,71 (5,19 – 9,65) p ₁ < 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	1,05 (0,64 – 1,77)	1,34 (0,52 – 3,07)	3,46 (2,47 – 4,45) p ₁ = 0,028	5,25 (3,04 – 9,21) p ₁ < 0,001	6,77 (3,64 – 10,82) p ₁ = 0,010

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Пониженное процентное содержание Th-клеток эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$), при повышении уровня терминально-дифференцированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^-$), и соответствии остальных исследуемых дифференцировочных субпопуляций Th-клеток контрольному диапазону у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения является следствием перенесенной иммунной атаки и отражается в ингибирование аутоиммунного процесса, подавлении активации, и дисфункции антигенспецифических Th-клеток, о чем свидетельствует их уровень в периферической крови. Но, в то же время, установленные изменения у пациентов с болезнью Грейвса подтверждают и развитие вторичных процессов иммуносупрессии, которые, вероятно, связаны с ликвидацией массы тиреоидспецифических антигенпрезентирующих клеток после тиреоидэктомии.

Содержание цитотоксических T-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлено в таблице 19.

При изучении фенотипического состава цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+$) у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения было установлено, что их уровень в периферической крови больных зависит от сроков наблюдения в послеоперационном периоде.

При изучении отдельных фракций цитотоксических T-клеток у пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения не было выявлено статистически значимых отличий в сравнении с контрольными показателями, что может реализовываться за счет медикаментозного эутиреоза, индуцированного консервативной терапией тиамазолом и, вероятно, свидетельствует об ингибировании аутоиммунного процесса, как за счет индукции эутиреоза, так и иммуномодулирующих влияний тиамазола на уровень отдельных дифференцировочных субпопуляций цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+$).

Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после оперативного лечения наблюдалось транзитное изменение в составе всех исследуемых субпопуляций цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+$).

Таблица 19 – Содержание цитотоксических Т-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,71 (0,57 – 0,77)	0,51 (0,35 – 0,74)	0,41 (0,32 – 0,53)	0,47 (0,45 – 0,63)	0,81 (0,66 – 1,31)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	8,46 (5,74 – 13,36)	6,71 (6,36 – 11,85)	9,69 (7,05 – 15,66) p _{1,2} < 0,001	10,41 (7,36 – 12,03) p ₂ = 0,003	11,27 (10,34 – 13,78) p ₂ < 0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	2,07 (1,53 – 3,16)	1,68 (0,71 – 2,04)	1,28 (1,07 – 1,47) p ₁ < 0,001	1,73 (1,21 – 2,12)	2,17 (1,72 – 2,55)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	7,17 (6,01 – 14,51)	5,49 (4,84 – 6,91)	4,46 (3,26 – 4,53) p ₁ < 0,001	6,45 (5,83 – 11,81)	5,72 (4,23 – 9,21)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	7,78 (5,63 – 14,72)	6,39 (4,06 – 11,72)	3,46 (2,47 – 4,45) p ₁ < 0,001	5,33 (3,08 – 9,21)	6,77 (3,64 – 8,82)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Установлено, что через 1 месяц после тиреоидэктомии у обследуемых больных статистически значимо повышено процентное число наивных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) цитотоксических Т-клеток, как относительно контрольных значений, так и величин, установленных при обследовании больных до операции. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после оперативного лечения процентное число цитотоксических Т-клеток центральной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^+$), эффекторной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^-$) и терминально-дифференцированных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62^+$) цитотоксических Т-клеток соответствует значениям, выявленным у больных при обследовании до операции. Но, в то же время, через 1 месяц после оперативного лечения в крови больных статистически значимо снижено, относительно контрольных величин, процентное число цитотоксических Т-клеток центральной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^+$), эффекторной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^-$) и терминально-дифференцированных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62^+$) цитотоксических Т-клеток, что может быть связано с ингибированием аутоиммунного процесса и развитием послеоперационного гипотиреоза.

Через 3 месяца после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса происходило восстановление всех исследуемых субпопуляций цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) до показателей контрольной группы.

Через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса все исследуемые фракции цитотоксических Т-клеток соответствуют значениям, выявляемым в контрольной группе, что отражает системное ингибирование аутоиммунного процесса. Следует отметить, что через 3 и 6 месяцев после оперативного лечения обнаружено транзиторное повышение процентного числа наивных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) цитотоксических Т-клеток, относительно значений, выявляемых до операции, но при соответствии их уровня контрольным величинам.

Абсолютный уровень цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения соответствовал контролю на протяжении всего периода наблюдения.

Субпопуляционный состав В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлен в таблице 20.

При изучении фенотипического состава В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения установлено перераспределение отдельных клеточных субпопуляций В-клеток относительно контрольных показателей.

Наиболее выраженные изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса выявлены при обследовании в состоянии медикаментозного эутиреоза, до операции. Установлено, что до операции в периферической крови обследуемых больных статистически значимо повышается процентное число общей фракции В-клеток ($CD19^+$), В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) и В2-клеток ($CD19^+CD5^-$), наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-$), но при снижении В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) относительно контрольных величин. Через 1 месяц после операции у пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) снижается, но процентное число В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) остается повышенным относительно значений, установленных в группе контроля. Причем, через 3 месяца после операции у пациентов с болезнью Грейвса процентный уровень В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) статистически значимо снижается в сравнении с показателями до и через 1 месяц после операции, и восстанавливается до контрольных значений.

Однако, через 6 месяцев после оперативного лечения у обследуемых больных установлен пониженный процентный уровень В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$). Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса наблюдаются изменения в процентном содержании В1-клеток ($CD19^+CD5^+$), которые зависят от сроков наблюдения в послеоперационном периоде. Обнаружено, что до оперативного лечения в периферической крови обследуемых больных наблюдается повышение процентного числа В1-клеток ($CD19^+CD5^+$), которое сменяется снижением их процентного содержания через 1 месяц после операции и последующим транзиторным увеличением через 3 месяца после операции, но при снижении через 6 месяцев после оперативного лечения относительно контрольных величин.

Таблица 20 – Субпопуляционный состав В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,24 (0,22 – 0,34)	0,39 (0,27 – 0,49)	0,27 (0,19 – 0,39)	0,24 (0,12 – 0,29)	0,24 (0,13 – 0,33)
CD19 ⁺ , %	11,21 (10,03 – 14,61)	15,82 (11,61 – 21,72) p ₁ < 0,001	14,22 (11,68 – 18,47)	11,12 (7,94 – 14,13)	11,83 (9,17 – 13,05)
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,77 (1,22 – 2,61)	2,47 (1,72 – 3,73) p ₁ = 0,002	1,75 (0,53 – 2,41) p ₁ = 0,025	3,31 (1,09 – 4,58) p ₁ = 0,025	1,22 (0,75 – 2,11) p ₁ = 0,020 p ₄ < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	9,45 (8,12 – 11,01)	12,91 (8,97 – 17,89) p ₁ = 0,001	13,68 (10,22 – 15,61) p ₁ = 0,001	9,04 (5,83 – 9,96) p ₂ = 0,021 p ₃ = 0,013	9,36 (7,55 – 11,75) p ₂ = 0,002 p ₃ = 0,011

Продолжение таблицы 20

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	8,03 (5,91 – 11,52)	13,53 (9,37 – 19,34) p ₁ < 0,001	10,92 (5,98 – 14,27)	10,05 (4,83 – 11,64)	9,31 (6,67 – 10,61)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	3,21 (2,13 – 4,42)	2,35 (1,83 – 3,32) p ₁ = 0,002	3,29 (1,81 – 4,66)	2,19 (1,37 – 3,67) p ₁ = 0,021	2,01 (1,45 – 5,75) p ₁ = 0,020 p ₃ = 0,012

Примечание. p₁— статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃— -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄— -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

В то же время, уже через 3 месяца после оперативного лечения установлена нормализация процентного уровня В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при их исходно повышенном содержании. Низкий процентный уровень В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) выявляется в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса, как до, так, и в динамике после оперативного лечения. Следует отметить, что через 1 месяц после операции у пациентов с болезнью Грейвса выявлено статистически значимое восстановление В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) до уровня контроля, но с последующим снижением их процентного числа через 3 и 6 месяцев после оперативного лечения. Причем, наиболее низкий уровень В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) в периферической крови больных зафиксирован через 6 месяцев после операции. Абсолютное число В-клеток ($CD19^+$) в крови у пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольным показателям, как до, так и в динамике после оперативного лечения.

Таким образом, процентный уровень В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса низкий, как на фоне стойкого медикаментозного эутиреоза, до операции, так и через 6 месяцев после оперативного лечения. Пониженное процентное число В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) и восстановление количества В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после операции, вероятно, связано с ингибированием аутоиммунного процесса и снижением продукции антител к рТТГ В-лимфоцитами.

Процентное содержание активированных В-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлено в таблице 21.

При изучении количества активированных В-клеток в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения установлено, что наиболее выраженные изменения в числе исследуемых субпопуляций происходят в содержании активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$).

Таблица 21 – Содержание активированных В-клеток в крови (в %) у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺ CD23 ⁺	1,51 (0,62 – 6,13)	4,61 (2,02 – 8,81)	3,51(0,64 – 7,76)	5,37 (2,57 – 6,73)	0,06 (0,03 – 0,15) p _{1,2,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺	0,24 (0,08 – 0,62)	0,96 (0,57 – 1,85) p ₁ < 0,001	0,37 (0,11 – 1,25) p ₁ < 0,001	2,14 (0,58 – 3,07) p _{1,2,3} < 0,001	0,03 (0,02 – 0,11) p _{1,2,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD23 ⁺	0,24 (0,14 – 4,44)	3,49 (2,51 – 7,64) p ₁ < 0,001	2,97 (0,56 – 6,23) p ₁ = 0,003	3,26 (1,11 – 4,06) p ₁ = 0,010	0,05 (0,03 – 0,36) p _{1,2,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD23 ⁺	0,49 (0,09 – 7,76)	2,16 (0,84 – 7,51)	1,08 (0,11 – 5,01) p ₁ = 0,039	1,32 (0,44 – 3,08)	0,02 (0,01 – 0,17)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺	0,40 (0,20 – 0,92)	0,17 (0,09 – 0,45) p ₁ < 0,001	0,25 (0,11 – 0,44) p ₁ < 0,001	0,07 (0,01 – 0,22) p ₁ < 0,001	0,009 (0,003 – 0,21) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса, до операции статистически значимо повышается процентное количество активированных В1- ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$), но при снижении числа активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в сравнении со значениями, выявляемыми в контрольной группе. Данный факт, выявленный у пациентов с болезнью Грейвса, может, с одной стороны, отражать наличие избыточной антигенной стимуляции клеток иммунной системы, приводящий к увеличению числа активированных наивных В1- и В2-клеток, но, с другой стороны, указывает на наличие первичного дефекта в иммунной системе, связанного с исходно низким уровнем активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) или миграцией их из периферического кровотока в ткань щитовидной железы.

Следует подчеркнуть, что установленные различия в количестве вышеуказанных субпопуляций активированных В-клеток у пациентов с болезнью Грейвса зафиксированы при обследовании до операции, в состоянии медикаментозного эутиреоза. Следовательно, достижение медикаментозного эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса не сопровождается восстановлением отдельных субпопуляций активированных В-клеток.

Через 1 месяц после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса в крови выявлялось статистически значимое повышение числа активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) и наивных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-CD23^+$), но при снижении уровня активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) относительно контрольных величин.

Установлено, что через 3 месяца после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо повышается процентное число активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1 месяц после оперативного лечения. Количество активированных В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) у пациентов с болезнью Грейвса при обследовании через 3 месяца после тиреоидэктомии оставалось повышенным относительно контрольных показателей. Однако, процентное число активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) у паци-

ентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после оперативного лечения оставалось пониженным в сравнении с показателями контрольной группы.

Через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса значительно снижалось процентное число активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$), активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$), как в сравнении с контрольными показателями, так и с величинами, установленными при обследовании больных до и через 1 и 3 месяца после оперативного лечения. Пониженное число активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$), выявляемое в крови пациентов с болезнью Грейвса на протяжении всего периода наблюдения свидетельствует о первичном нарушении созревания и дифференцировки исследуемой клеточной популяции [51].

Таким образом, через 6 месяцев после тиреоидэктомии в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса установлено статистически значимое снижение процентного числа активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$), В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$), а также активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-CD23^+$), в сравнении с показателями, установленными в группе контроля. Отклонения от нормативных значений в процентном количестве активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) в периферической крови, выявленные у пациентов с болезнью Грейвса в отдаленные сроки после оперативного лечения, могут быть проявлением системного истощения В-клеток, связанного, с перенесенным длительным воздействием антигенного стимула. В то же время, монотонно низкий уровень активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса позволяет отнести данную субпопуляцию В-клеток к одной из первично дефектных в системе иммунорегуляции, количественный состав которой не зависит, ни от наличия компенсированного гипертиреоза при консервативной терапии тиамазолом, ни от ликвидации органа-мишени после тиреоидэктомии.

При более детальном изучении уровня экспрессии активационного маркера MFI CD23 на основных субпопуляциях В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса, в динамике после оперативного лечения установлены изменения в чис-

ленности экспрессирующих MFI CD23 В-клеток, как до, так и в динамике после оперативного лечения.

Уровни экспрессии MFI CD23 на основных субпопуляциях В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлены в таблице 22.

У пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения в периферической крови выявляется снижение экспрессирующих MFI CD23 В1-клеток ($CD19^+CD5^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) и наивных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-$) относительно контрольных значений. При этом, число MFI CD23 экспрессирующих В-клеток ($CD19^+$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) у пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения соответствовало контрольному диапазону.

Через 1 месяц после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса выявлялось статистически значимое повышение В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) в сравнении с показателями, выявляемыми до оперативного лечения. Однако, через 1 месяц после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса уровень всех исследуемых экспрессирующие MFI CD23 субпопуляций В-клеток соответствовал контрольным величинам.

Установлено, что через 3 месяца после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса процентное число MFI CD23 экспрессирующих В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) снижается, как относительно контрольного диапазона, так и значений, установленных до и через 1 месяц после оперативного лечения. При этом, у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после тиреоидэктомии уровень экспрессии MFI CD23 повышается на В2-клетках ($CD19^+CD5^-$) относительно значений, установленных до операции и снижается на наивных В-клетках памяти ($CD19^+CD27^-$) относительно значений, установленных при обследовании через 1 месяц после операции.

Однако, через 3 месяца после тиреоидэктомии статистически значимых различий по уровню экспрессии CD23 (MFI) на основных субпопуляциях В-лимфоцитов относительно контрольных величин не установлено.

Таблица 22 – Уровни экспрессии CD23 (MFI) на основных субпопуляциях В-лимфоцитов (в относительных единицах) у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения, n = 120			
		До операции 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺	3,78 (3,31 – 4,77)	3,96 (0,91 – 6,96)	3,42 (0,76 – 7,49)	4,51 (0,81 – 9,03)	5,89 (0,09 – 8,07) p ₁ < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁺	6,58 (5,91 – 8,46)	4,32 (0,65 – 6,08) p ₁ = 0,020	7,28 (3,09 – 9,28)	1,25 (0,91 – 10,21) p _{1,2,3} < 0,001	0,92 (0,73 – 9,03) p _{1,2,3} < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻	5,28 (5,07 – 5,55)	0,09 (1,61 – 5,48) p ₁ = 0,038	3,02 (0,76 – 6,14) p ₂ < 0,001	4,23 (2,24 – 3,31) p ₂ < 0,001	5,97 (0,76 – 6,54) p _{1,2} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁻	4,41 (4,13 – 4,61)	0,06 (0,03 – 4,72) p ₁ < 0,001	3,06 (0,81 – 6,26) p ₂ = 0,005	1,06 (0,89 – 4,33) p ₃ = 0,003	0,21 (0,12 – 5,88) p _{1,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁺	6,19 (5,62 – 6,85)	5,23 (0,73 – 6,23)	3,65 (0,91 – 8,59)	4,61 (1,24 – 10,06)	6,31 (0,95 – 8,46)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

Через 6 месяцев после оперативного лечения в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса выявлялось статистически значимое повышение уровня экспрессии MFI CD23 на В-клетках (CD19⁺) и В2-клетках (CD19⁺CD5⁻), но при снижении уровня экспрессии MFI CD23 на В1-клетках (CD19⁺CD5⁺) и наивных В-клетках памяти (CD19⁺CD27⁻), в сравнении со значениями, установленными в группе контроля. Причем, уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках (CD19⁺CD5⁺) выявлялся низким, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых до и через 1 месяц после оперативного лечения.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса уровень экспрессии MFI CD23 на наивных В-клетках памяти (CD19⁺CD27⁻) определялся исходно низким, относительно контрольных величин, через 1 месяц после оперативного лечения статистически значимо повышался и соответствовал контролю, но через 3 месяца снова снижался, и через 6 месяцев после тиреоидэктомии определялся на минимальном уровне, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых через 1 и 3 месяца после оперативного лечения. Однако, уровень экспрессии MFI CD23 на зрелых В-клетках памяти (CD19⁺CD27⁺) статистически значимо не отличался от показателей, выявляемых в группе контроля на протяжении всего периода наблюдения после оперативного лечения.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения происходят адаптивные изменения в фенотипическом составе Т- и В-лимфоцитов, которые, вероятно, связаны с устранением органа-мишени и уменьшением титра циркулирующих антител к рТТГ. Снижение процентного числа В1-клеток (CD19⁺CD5⁺), В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺), процентного числа активированных В-клеток (CD19⁺CD23⁺), В1-клеток (CD19⁺CD5⁺CD23⁺), В2-клеток (CD19⁺CD5⁻CD23⁺) и В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺CD23⁺) у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения может быть проявлением ингибирования аутоиммунного процесса.

Однако, через 6 месяцев после тиреоидэктомии в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса остается пониженным процентное число общей фрак-

ции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, при повышении процентного числа терминально-дифференцированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^-$) и уровня экспрессии MFI CD23 на В-клетках ($CD19^+$), и В2-клетках ($CD19^+CD5^-$), что является отражением регуляторного дефекта Treg. Следовательно, у пациентов с болезнью Грейвса с предварительно достигнутым медикаментозным эутиреозом после тиреоидэктомии сохраняется количественный и регуляторный дефект Treg, который может являться мишенью для разработки иммуотропной терапии заболевания.

5.3. Сравнительная характеристика фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии

По современным представлениям, для разработки таргетной терапии, направленной на подавление аутоиммунного процесса при болезни Грейвса, необходимо охарактеризовать внутрисистемные механизмы регуляции функции В-лимфоцитов [76, 134, 163]. Одним из основных внутрисистемных механизмов предотвращения и ингибирования аутоиммунных процессов является супрессия функциональной активности Th-клеток [145, 259, 342]. В связи с этим, при исследовании иммунопатогенеза болезни Грейвса активно обсуждается роль Treg. Однако, механизмы иммунорегуляции между Treg, Th-клетками и функциональной активностью В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса раскрыты до сих пор не полностью. Учитывая то, что в основе болезни Грейвса лежит органоспецифический аутоиммунный процесс, то механизмы иммунорегуляции должны быть охарактеризованы в сравнительном аспекте – в крови и ткани щитовидной железы [118]. В связи с этим, задачей данного этапа исследования являлось сравнительное изучение фенотипического состава Treg, Th-клеток и В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии.

Сравнительное исследование фенотипического состава клеток иммунной системы проводилось путем измерения содержания Т- и В-лимфоцитов в операционных образцах периферической крови и ткани щитовидной железы. Образцы периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса забирались в день операции, утром натощак, в состоянии медикаментозного эутиреоза. Интраоперационное выделение и пробоподготовка образцов ткани щитовидной железы, а также методика выделения лимфоцитов из ткани щитовидной железы для иммунологического исследования подробно представлены в главе 2.

Содержание Th-клеток и Treg в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлено в таблице 23. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса процентное число Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) в периферической крови соответствует контрольным значениям. Подобное процентное содержание данных фракций Т-лимфоцитов выявляется у пациентов с болезнью Грейвса и в ткани щитовидной железы. Данный феномен у пациентов с болезнью Грейвса свидетельствует не только об ингибировании аутоиммунного процесса, как на уровне органа-мишени, так и системно, но и может отражать иммуномодулирующие эффекты консервативной терапии тиамазолом. Однако, уровень общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в крови у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижен по сравнению с контрольными значениями. Процентное содержание общей фракции Treg в ткани щитовидной железы при болезни Грейвса соответствует их уровню в крови.

Известно, что Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) являются одной из основных субпопуляций Th-клеток, осуществляющих контроль развития гипериммунных состояний, включая аутоиммунные заболевания [279]. Следовательно, выявленное относительно контрольных значений сниженное количество Treg в крови у пациентов с болезнью Грейвса отражает органоспецифичный первичный дефект иммунорегуляции, локализованный в щитовидной железе, так как уровень Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в ткани щитовидной железы у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса соответствует их содержанию в крови.

Таблица 23 – Содержание Th- и T-регуляторных клеток в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса (Me, Q₁– Q₃)

Показатели	Контроль n = 85		Пациенты с болезнью Грейвса n = 75			
	1		В крови 2		В ткани 3	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,96	0,82 – 1,18	1,32	0,75 – 1,46	-	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,72	37,81 – 48,01	45,05	35,31 – 53,12	36,42	30,07 – 49,21
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,12	0,03 – 0,68	1,03	0,02 – 1,32	1,24	0,04 – 2,24
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	1,55	0,83 – 3,09	0,81	0,11 – 2,21 p ₁ =0,021	1,01	0,12 – 3,01

Примечание: p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Следует подчеркнуть, что изменений содержания Th-клеток в крови, экспрессирующих и не экспрессирующих CD25-рецептор, у пациентов с болезнью Грейвса, по сравнению с контрольными значениями не обнаружено, что, также, может являться одним из иммуномодулирующих эффектов длительной консервативной терапии тиамазолом и поддержания стойкого медикаментозного эутиреоза.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса уровень Th-клеток и CD25-экспрессирующих Th-клеток в ткани щитовидной железы статистически значимо не отличается от содержания данных субпопуляций в крови, что свидетельствует и об интратиреоидном ингибировании аутоиммунного процесса и подтверждает органоспецифичное иммуномодулирующее влияние тиамазола на систему адаптивного иммунитета, с учетом его избирательного накопления в щитовидной железе.

Ключевым звеном, связанным с дефектом Treg, в иммунопатогенезе болезни Грейвса является появление на периферии «запрещенного» клона В-лимфоцитов, который способен синтезировать TSAb [3, 61, 150]. Показано, что выключение функционирования В-лимфоцитов приводит к резкому снижению уровня аутоантител TSAb и ингибированию гипертиреоза [188]. Известно, что субпопуляции В-лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу, состоят из комбинации IgM позитивных В-клеток, напоминающих В-лимфоциты маргинальной зоны, и В-клеток памяти с переключенным изотипом Ig (CD27⁺IgG⁺/IgA⁺) [44].

Фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлен в таблице 24.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в периферической крови по сравнению с контрольными значениями в 1,6 раз повышено процентное количество В1-клеток (CD19⁺CD5⁺). В ткани щитовидной железы количество В1-клеток (CD19⁺CD5⁺) у пациентов с болезнью Грейвса снижено в 2,4 раза по сравнению с их числом, выявленным в периферической крови.

Следует отметить, что В1-лимфоциты являются минорной фракцией В-клеток, локализуются преимущественно в брюшной и плевральной полостях, синтезируют Ig M и Ig A к бактериальным антигенам [33].

Таблица 24 – Фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль		Пациенты с болезнью Грейвса n = 75			
	n = 85		В крови		В ткани	
	1		2		3	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,24	0,22 – 0,34	0,28	0,17 – 0,37	-	
CD19 ⁺ , %	11,21	10,03 – 14,61	10,63	7,91 – 16,25	12,13	10,41 – 21,32
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	9,45	8,12 – 11,01	10,61	7,42 – 15,21	12,63	10,92 – 27,03
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,77	1,22 – 2,61	2,91	0,87 – 4,06	1,21	0,67 – 2,33
			p ₁ = 0,002		p ₂ = 0,023	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	8,03	5,91 – 11,52	8,91	7,43 – 15,21	9,73	5,73 – 14,12
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	3,21	2,13 – 4,42	2,63	1,39 – 3,21	4,76	2,52 – 7,21
			p ₁ = 0,010		p ₂ = 0,021	

Примечание: p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Однако, следует, также, отметить, что субпопуляция В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) способна выполнять роль антигенпрезентирующих клеток [59].

Сравнительное исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы позволило установить, что у пациентов с болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы, по сравнению с уровнем, выявленным в периферической крови, в 1,8 раз увеличено количество В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$).

Однако, в крови количество В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо ниже в сравнении с контрольными величинами. Учитывая выявленную ранее закономерность низкого процентного уровня В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) в крови больных до оперативного лечения можно предположить, что низкий уровень В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) у пациентов с болезнью Грейвса в крови обусловлен их миграцией в ткань щитовидной железы. В то же время, процентный уровень В-лимфоцитов ($CD19^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-$), а также наивных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-$) у пациентов с болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы статистически значимо не изменяется в сравнении с величинами, установленными у больных в периферической крови.

Экспрессия CD23-антигена была исследована в качестве функционального активационного маркера В-лимфоцитов. Процентное содержание активированных В-клеток в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлено в таблице 25.

При изучении процентного содержания активированных В-лимфоцитов, экспрессирующих низкоаффинный рецептор для IgE, в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса установлено, что в периферической крови обследуемых больных по сравнению с контрольными значениями статистически значимо снижено число активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$).

В ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса процентное число активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$) остается сниженным, по сравнению с уровнем, выявленным в периферической крови.

Таблица 25 – Содержание активированных В-клеток в крови и ткани щитовидной железы (в %) у пациентов с болезнью Грейвса (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85		Пациенты с болезнью Грейвса n = 75			
	1		В крови 2		В ткани 3	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
CD19 ⁺ CD23 ⁺	1,51	0,62 – 6,13	0,81	0,79 – 4,87	0,15	0,12 – 3,31
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,033	
CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD23 ⁺	0,24	0,14 – 4,44	0,11	0,01 – 3,34	0,10	0,09 – 2,61
			p ₁ < 0,001			
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺	0,24	0,08 – 0,62	0,21	0,06 – 4,21	0,07	0,02 – 3,23
					p ₂ = 0,029	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD23 ⁺	0,49	0,09 – 7,76	0,15	0,005 – 5,32	0,04	0,01 – 2,73
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,027	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺	0,40	0,20 – 0,92	0,14	0,12 – 0,54	0,82	0,41 – 3,27
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,032	

Примечание: p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Кроме того, у пациентов с болезнью Грейвса в периферической крови, по сравнению с контрольными показателями, статистически значимо снижено процентное содержание активированных В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$), наивных ($CD19^+CD27^-CD23^+$) и зрелых ($CD19^+CD27^+CD23^+$) В-клеток памяти, что согласуется с результатами, полученными и при обследовании больных в динамике после оперативного лечения. При этом, в ткани щитовидной железы, относительно значений выявленных в периферической крови, у пациентов с болезнью Грейвса, статистически значимо снижено процентное содержание активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и наивных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-CD23^+$), но при повышении в 5,8 раз процентного числа В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$), экспрессирующих CD23-рецептор.

Следует подчеркнуть, что установленный ранее низкий процентный уровень, как В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$), так и активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения может объясняться миграцией клеток с данным фенотипом в ткань щитовидной железы.

С помощью корреляционного анализа исследованы взаимосвязи между содержанием различных фракций Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и фенотипическим составом В-лимфоцитов. Обнаружено, что у лиц контрольной группы процентное число Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в крови положительно взаимосвязано с содержанием активированных В-лимфоцитов ($CD19^+CD23^+$), $r = 0,32$, $p = 0,030$, В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), $r = 0,36$, $p = 0,010$, наивных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^-CD23^+$), $r = 0,42$, $p = 0,001$ и активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$), $r = 0,51$, $p < 0,001$. Выявленные взаимосвязи в контрольной группе характеризуют обычный иммунорегуляторный процесс, который развивается в ответ на увеличение количества активированных В-лимфоцитов в периферической крови.

У пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание В-лимфоцитов ($CD19^+$) в крови положительно коррелирует с процентным уровнем активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$), $r = 0,46$, $p = 0,003$ и процентным числом Treg

(CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}), $r = 0,54$, $p = 0,010$. Взаимосвязи в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса, также формируются корреляциями процентного числа В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺) и В2-клеток (CD19⁺CD5⁻) с уровнями активированных Th-клеток (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), соответственно, $r = 0,56$, $p < 0,001$ и $r = 0,51$, $p = 0,002$, а также процентным числом Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}), соответственно, $r = 0,61$, $p < 0,001$ и $r = 0,52$, $p = 0,011$. У пациентов с болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы процентное количество Th-клеток (CD3⁺CD4⁺) коррелирует с уровнем активированных В1-клеток (CD19⁺CD5⁺CD23⁺), $r = 0,81$, $p = 0,030$. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса количество активированных Th-клеток (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) в ткани щитовидной железы взаимосвязано с процентным содержанием активированных В-клеток (CD19⁺CD23⁺), $r = 0,87$, $p = 0,010$, В1-клеток (CD19⁺CD5⁺CD23⁺), $r = 0,93$, $p = 0,012$, В2-клеток (CD19⁺CD5⁻CD23⁺), $r = 0,86$, $p = 0,030$, и В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺CD23⁺), $r = 0,85$, $p = 0,021$.

Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса корреляции уровня Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}) в ткани щитовидной железы с отдельными субпопуляциями Th-клеток и В-лимфоцитов не выявлены. Однако, установлена положительная взаимосвязь между процентным содержанием Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}) в крови и ткани щитовидной железы, $r = 0,58$, $p = 0,001$, что доказывает единство внутрисистемного дефекта Treg, проявляющегося, как в ткани щитовидной железы, так и в периферической крови.

Следующим этапом исследования являлось изучение особенностей интратиреоидного фенотипического состава Т- и В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от варианта течения заболевания, что представляется значимым для уточнения интратиреоидных механизмов рецидивирования заболевания и иммуномодулирующих эффектов тиамазола, с учетом его избирательной концентрации в щитовидной железе.

Содержание Т- и В-лимфоцитов в щитовидной железе у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и при рецидиве заболевания представлено в таблице 26.

Таблица 26 – Содержание Т- и В-лимфоцитов в щитовидной железе у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и при рецидиве заболевания (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Впервые выявленная болезнь Грейвса n = 18	Рецидив болезни Грейвса n = 57	p
CD3 ⁺ , %	55,31 (43,30 – 64,81)	65,32 (55,42 – 83,61)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	44,42 (41,72 – 58,42)	42,91 (35,12 – 48,92)	-
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	12,61 (9,11 – 26,12)	29,14 (21,33 – 40,63)	0,003
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	4,06 (2,36 – 7,15)	1,52 (0,34 – 3,91)	0,005
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	1,52 (0,91 – 3,25)	0,81 (0,33 – 3,06)	< 0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	1,34 (0,23 – 3,24)	1,15 (0,42 – 2,15)	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} , %	1,02 (0,60 – 2,91)	2,69 (0,89 – 3,15)	0,002
CD19 ⁺ , %	14,81 (13,51 – 15,42)	12,41 (9,42 – 18,11)	-
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	13,23 (10,61 – 16,72)	12,81 (10,42 – 25,43)	-
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,34 (1,05 – 2,61)	0,51 (0,25 – 1,89)	0,010
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	11,06 (8,72 – 17,09)	9,51 (5,72 – 13,61)	-
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	3,33 (2,32 – 3,42)	5,81 (2,69 – 8,15)	< 0,001

Примечание: p – статистически значимые различия между показателями пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и с рецидивом заболевания.

Сравнительное исследование содержания Т- и В-лимфоцитов в ткани щитовидной железы у обследуемых пациентов после тиреоидэктомии, в зависимости от варианта течения заболевания, позволило установить выраженные отличия в группе больных с рецидивом.

Установлено, что у пациентов с рецидивом болезни Грейвса статистически значимо, в сравнении с показателями пациентов с впервые выявленным заболеванием, в ткани щитовидной железы повышено процентное число Т-клеток ($CD3^+$), цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$), Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$). Однако, процентное содержание интратиреоидных активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и В1-клеток ($CD19^+CD5^+$) у пациентов с рецидивирующим течением заболевания снижено, относительно величин, установленных у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса.

Следует отметить, что выявленные особенности содержания интратиреоидных Т- и В-лимфоцитов у пациентов с рецидивирующим течением заболевания доказывают, что длительная консервативная терапия тиамазолом оказывает иммуномодулирующее действие на систему адаптивного иммунитета на уровне щитовидной железы. Причем, выявленный органоспецифический иммуномодулирующий эффект тиамазола при рецидивирующем течении заболевания и повторяющейся реактивации аутоиммунного процесса, вероятно, связан с миграцией цитотоксических Т-клеток, Treg и В-клеток памяти в ткань щитовидной железы. Последующее избирательное накопление тиреостатика в щитовидной железе, прерывание синтеза тиреоидных гормонов и купирование гипертиреоза приводит к снижению активированных Th-клеток и адаптивным изменениям интратиреоидного фенотипического состава клеток иммунной системы, которые в последующем отражаются и в системном ингибировании аутоиммунного процесса. Полученные данные демонстрируют и то, что выявленная ранее повышенная миграционная способность клеток иммунной системы из периферической крови в ткань щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса более выражена при рецидиве заболевания и является компенсаторной системной иммунной реакцией, отражающей интратиреоидный аутоиммунный процесс.

С помощью корреляционного анализа исследованы особенности взаимосвязей между процентным содержанием интратиреоидных Т- и В-лимфоцитов у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и с рецидивом заболевания.

Установлено, что только при рецидивирующем течении заболевания выявляются сильная отрицательная взаимосвязь между количеством интратиреоидных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) и концентрацией ТТГ ($r = -0,97$, $p < 0,001$), а также одна положительная связь между содержанием интратиреоидных Т-клеток ($CD3^+$) и уровнем антител к ТПО ($r = 0,65$, $p < 0,001$). Следует подчеркнуть, что у обследованных пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса взаимосвязей содержания Т- и В-лимфоцитов в ткани щитовидной железы с другими исследуемыми показателями не установлено. Выявленные взаимосвязи подтверждают роль гипертиреоза в поддержании аутоиммунной реакции, связанной с повышением интратиреоидных В-клеток памяти, а также количественную связь нарастания титра антител к ТПО с увеличением общего числа Т-клеток в ткани щитовидной железы при рецидиве болезни Грейвса.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса в периферической крови повышено содержание В1-клеток, в ткани щитовидной железы процентное количество В1-клеток снижено относительно уровня, выявленного в крови. У пациентов с болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы процентное содержание В-клеток памяти повышено, относительно их содержания в крови. Общее количество активированных В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса снижено относительно контрольных значений.

В ткани щитовидной железы выявляется еще более выраженное снижение процентного содержания активированных В-клеток по сравнению с уровнем, установленным у пациентов с болезнью Грейвса в крови. Полученные данные демонстрируют, что фенотипический состав лимфоцитов периферической крови при болезни Грейвса отражает аутоиммунный процесс в щитовидной железе, как выражение генерализованной активации иммунной системы и последующими органоспецифическими адаптивными изменениями в системе интратиреоидного иммунитета при консервативной терапии тиамазолом, которые особенно выражены у пациентов с рецидивирующим течением заболевания.

Установлены нарушения иммунорегуляторных взаимодействий Treg, Th-клеток и отдельных субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови и ткани

щитовидной железы. У пациентов с болезнью Грейвса в крови с уровнем В-лимфоцитов положительно взаимосвязаны, как активированные Th-клетки, так и Treg.

Причем, взаимосвязи Т-лимфоцитов периферической крови при болезни Грейвса реализуются только по отношению к В-лимфоцитам (общие В-лимфоциты, В2-клетки и наивные В-лимфоциты), не экспрессирующих активационный маркер CD23. Однако, в ткани щитовидной железы в системе взаимосвязей участвуют только активированные В-лимфоциты (общие В-клетки, В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти), с одной стороны, и Th-клетки, экспрессирующие и не экспрессирующие CD25-рецептор, с другой стороны. Следовательно, если в системе иммунорегуляторных взаимосвязей у пациентов с болезнью Грейвса в крови не принимают участие активированные В-лимфоциты, то в ткани щитовидной железы – Treg.

Полученные результаты позволяют заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса, с предварительно достигнутым медикаментозным эутиреозом, после тиреоидэктомии, пониженное относительное число Treg в периферической крови соответствует их уровню в ткани щитовидной железы. У пациентов с болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы Treg полностью исключены из системы взаимосвязей с активированными Th-клетками и В-лимфоцитами, но уровень Treg в периферической крови коррелирует с их уровнем в ткани щитовидной железы.

Таким образом, при болезни Грейвса изменяется не только количество Treg в периферической крови, но и нарушается их регуляторная функция. Повышение процентного числа В-клеток памяти, соответственно, экспрессирующих и не экспрессирующих активационный маркер CD23 в ткани щитовидной железы, в сравнении с их уровнем, установленным в периферической крови, существенно дополняет концепцию о сигнализации иммуноцитов и клеток-мишеней при болезни Грейвса, и может служить основой для разработки иммунотропной терапии заболевания.

5.4. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Особенности метаболизма и функциональной активности клеток иммунной системы могут определять направленность аутоиммунного процесса и играть существенную роль в развитии рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса. В этой связи, генерация АФК при болезни Грейвса может усиливать дефект Treg и продукцию В-лимфоцитами TSAb, что вносит дополнительный вклад в развитие и поддержания патологического процесса [139]. Следовательно, для разработки специфической таргетной терапии, направленной на подавление аутоиммунного процесса при болезни Грейвса, необходимо охарактеризовать и внутрисистемные механизмы регуляции окислительного стресса и уровень продукции АФК после удаления органа-мишени.

Окислительный стресс при болезни Грейвса приводит к повреждению периферических тканей, способствуя, как клиническому проявлению тиреотоксикоза, так и цитопатогенному воздействию на тиреоциты с последующей потерей аутоотолерантности к собственным антигенам щитовидной железы [39]. В некоторых работах показано, что у пациентов, принимавших антитиреоидные препараты, снижается активность НК-клеток и ингибируется образование кислородных радикалов [192]. Однако, функционирование НАДФН-оксидазного комплекса и уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии до сих пор не изучены, но являются значимыми, так как уровень АФК и ингибирование аутоиммунного процесса в условиях устранения органа-мишени тесно связаны. Учитывая, что цитопатогенное действие нейтрофилов связано главным образом с генерацией АФК, одним из современных методов, позволяющих количественно оценить уровень продукции кислородных радикалов, является хемилюминесцентный анализ [24]. Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (n = 120)			
		До операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Спонтанная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	1741 (1398 – 2057)	1611 (1329 – 2366)	1420 (1085 – 2389) p ₁ = 0,021	1863 (513 – 3079) p ₃ = 0,011	1977 (1627 – 2138) p _{2,3} < 0,001
I _{max} , о.е.×10 ³	10,15 (0,87 – 28,59)	4,48 (1,19 – 9,01) p ₁ = 0,011	4,71 (3,31 – 9,01) p ₁ < 0,001	3,43 (0,45 – 5,36) p ₁ < 0,001	1,64 (0,45 – 3,08) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,012
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	1,74 (1,03 – 3,71)	12,04 (2,83 – 27,51) p ₁ < 0,001	17,67 (10,39 – 60,48) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,023	9,67 (1,84 – 17,67) p _{1,2} < 0,001	6,19 (1,61 – 12,02) p ₂ = 0,002 p ₃ < 0,001
Зимозан – индуцированная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	1275 (809 – 1768)	1246 (1011 – 1490)	1124 (1028 – 1682)	1468 (930 – 2208)	1397 (917 – 1906)
I _{max} , о.е.×10 ³	12,78 (6,45 – 42,81)	7,81 (2,72 – 14,57) p ₁ < 0,001	10,21 (2,36 – 23,59) p ₁ = 0,001	6,85 (1,14 – 9,36)	2,25 (1,01 – 11,04) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,025 p ₄ = 0,015

Продолжение таблицы 27

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (n = 120)			
		До операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Зимозан – индуцированная хемилюминесценция					
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31 (1,45 – 8,18)	21,49 (9,48 – 37,08)	32,36 (5,52 – 103,32)	21,69 (4,06 – 45,36)	7,96 (2,72– 32,24)
		p ₁ = 0,015	p ₁ = 0,023 p ₂ = 0,033	p _{1,3} < 0,001	p ₂ = 0,002 p _{3,4} < 0,001
Синд. /Спонт.	1,89 (0,99 – 3,22)	1,69 (0,92 – 3,40)	1,38 (0,53 – 2,12)	1,23 (0,31 – 2,26)	2,33 (1,32– 4,07)
		p ₁ = 0,035	p ₁ = 0,025		

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

При изучении кинетики спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови в динамике после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса установлены значительные отличия, как в сравнении с показателями контрольной группы, так и в зависимости от сроков наблюдения в послеоперационном периоде. У пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения отмечалось статистически значимое увеличение показателя суммарного синтеза (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов.

Но, в то же время, у пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения установлено снижение максимального уровня синтеза АФК (I_{max}) первичных АФК спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов при соответствии показателя скорости развития спонтанной хемилюминесцентной реакции (T_{max}) значениям, выявляемым в группе контроля.

Однако, через 1 месяц после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо замедлялась скорость (T_{max}) и снижалась интенсивность (I_{max}), при увеличении в 10,1 раз показателя суммарного синтеза первичных АФК (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольного диапазона. Причем, у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после тиреоидэктомии показатель суммарного синтеза (S) первичных АФК спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции в нейтрофилах крови возрастал в сравнении со значениями, установленными и у обследуемых больных до операции.

Через 3 месяца после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса наблюдалось статистически значимое увеличение скорости (T_{max}), при снижении в 1,8 раз суммарного синтеза первичных АФК (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов относительно значений, установленных при обследовании больных через 1 месяц после тиреоидэктомии. Показатель интенсивности (I_{max}) синтеза первичных АФК спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после тиреоидэктомии снижался, в сравнении с величинами, установленными в контрольной группе. Но, в то же время, установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после оперативного лечения сохраняется статистически значимое повышение показателя суммарного синтеза первичных АФК (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольного диапазона.

Через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо возрастала скорость (T_{max}), при снижении показателей максимального уровня синтеза АФК (I_{max}) и суммарного синтеза первичных АФК

(S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, в сравнении со значениями, установленными при обследовании больных до и через 1 месяц после тиреоидэктомии. Таким образом, показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии соответствовал значениям, выявляемым в контрольной группе.

При индукции оксидативного стресса в нейтрофилах крови пациентов с болезнью Грейвса до операции с помощью воздействия опсонизированного зимозана в ходе люцигенин-зависимой хемилюминесценции сохраняется выявленная ранее закономерность аутоиммунного процесса - статистически значимо, относительно контрольных величин, определяется пониженным показателем максимального уровня синтеза (I_{max}), при увеличении показателя суммарного синтеза первичных АФК (S).

Через 1 месяц после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса показатель максимального уровня синтеза (I_{max}) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается, относительно контрольных величин и соответствует значениям, установленным до операции. Однако, через 1 месяц после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов возрастает, соответственно, в 9,7 раз и 1,5 раз, относительно контрольных величин и значений, установленных при обследовании больных до операции.

Через 3 месяца после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса показатель максимального уровня синтеза первичных АФК (I_{max}) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов снижается до уровня, установленного до операции, и остается сниженным относительно контрольных значений. В то же время, через 3 месяца после операции у пациентов с болезнью Грейвса показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов снижает-

ся, относительно значений, выявляемых через 1 месяц после тиреоидэктомии, но остается повышенным, в сравнении с показателями контрольной группы.

Через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса показатель максимального уровня синтеза первичных АФК (I_{\max}) зимозан-ндуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании до операции, а также через 1 и 3 месяца после тиреоидэктомии. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения показатель суммарного синтеза первичных АФК (S) зимозан-ндуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, также, статистически значимо снижается относительно значений, выявляемых при обследовании до операции, а также через 1 и 3 месяца после тиреоидэктомии, но соответствует показателям контрольной группы.

Показатель скорости продукции первичных АФК (T_{\max}) при зимозан-ндуцированной люцигенин-зависимой реакции хемилюминесценции в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения соответствует показателям контрольной группы на протяжении всего периода наблюдения.

Индекс активации ($S_{\text{инд.}}/S_{\text{спонт.}}$) люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения статистически значимо не изменялся, как относительно контрольных величин, так и в зависимости от сроков наблюдения в послеоперационном периоде.

При изучении кинетики люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса, отражающей генерацию АФК в системе вторичных кислородных радикалов, в динамике после оперативного лечения были установлены значительные изменения, как относительно контрольных значений, так и в зависимости от сроков обследования в послеоперационном периоде. Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (n = 120)			
		До операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Спонтанная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	987 (627 – 2174)	1137 (594 – 1652)	1129 (477 – 1628)	324 (221 – 1132) p ₁ < 0,001	744 (426 – 1782)
I _{max} , о.е.×10 ³	39,85 (7,73 – 66,6)	33,65 (12,52 – 65,11) p ₁ < 0,001	50,67 (18,22 – 85,81) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,025	11,27 (3,16 – 25,23) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,023 p ₃ = 0,011	17,91 (3,99 – 39,71) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,032 p ₃ = 0,015
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	5,37 (3,08 – 13,45)	83,18 (21,34 – 193,21) p ₁ < 0,001	144,31 (47,01 – 277,06) p ₁ = 0,014 p ₂ = 0,020	27,61 (4,71 – 58,99) p ₁ = 0,001 p ₂ = 0,023 p ₃ = 0,011	51,26 (8,77 – 97,96) p ₁ = 0,006 p ₂ = 0,027 p ₃ = 0,010

Продолжение таблицы 28

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения (n = 120)			
		До операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Зимозан – индуцированная хемилюминесценция					
T _{max} , сек.	912 (631–1188)	963 (677 – 1240)	1091 (775 –1543)	1423 (979 – 2022)	504 (493 – 697) p ₁ = 0,032 p _{2,3,4} < 0,001
I _{max} , о.е.×10 ³	147,24 (17,75 – 247,37)	108,26 (37,17 – 166,84)	130,69 (65,23 – 215,64) p ₁ = 0,025 p ₂ = 0,030	57,01 (32,81 – 101,25) p _{2,3} < 0,001	39,13 (31,24 – 72,51) p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,020 p ₃ = 0,013
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	16,05 (6,59 – 35,74)	259,21 (59,82 – 460,31) p ₁ < 0,001	368,25 (142,21 – 662,12) p _{1,2} < 0,001	142,03 (121,61 – 204,23) p ₁ = 0,021 p _{2,3} < 0,001	161,24 (142,16 – 183,06) p ₁ = 0,010 p _{2,3} < 0,001
Синд. /Спонт.	2,26 (1,34 – 3,95)	2,38 (1,49 – 4,08)	2,41 (1,47 – 3,31)	3,92 (2,21 – 6,62)	1,64 (1,23 – 6,78)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до операции, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после операции, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после операции.

При изучении спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса до операции наблюдалось незначительное снижение показателя интенсивности (I_{\max}), при увеличении в 15,4 раз суммарной продукции вторичных АФК относительно контрольных величин.

Через 1 месяц после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса отмечено статистически значимое повышение показателей интенсивности (I_{\max}) и суммарного синтеза вторичных АФК (S) спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, в сравнении со значениями, выявляемыми в группе контроля, а также до операции, соответственно, в 1,3 раза и 1,5 раз, а также в 26,8 раз и 1,7 раз. Через 3 месяца после операции при спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо, в сравнении с контрольными величинами замедляется скорость (T_{\max}) и снижался показатель интенсивности (I_{\max}) образования вторичных АФК, как относительно контроля, так и значений, выявленных при обследовании больных до и через 1 месяц после тиреоидэктомии. Следует подчеркнуть, что при спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после оперативного лечения происходило статистически значимое снижение показателя суммарного синтеза вторичных АФК (S) относительно значений, установленных при обследовании больных до операции, а также через 1 месяц после оперативного лечения, но при сохранении повышенным в 5,1 раз в сравнении с его уровнем в контрольной группе.

При клинико-иммунологическом обследовании пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов снижался в сравнении с его уровнем, установленным до и через 1 месяц после тиреоидэктомии, но оставался повышенным в 9,5 раз относительно контрольного диапазона.

В ходе зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвс до оперативного лечения выявлено снижение интенсивности (I_{\max}) образования вторичных АФК нейтрофилов

крови, но при повышении в 16,1 раз показателя суммарного синтеза вторичных АФК (S), в сравнении с величинами, установленными в группе контроля. Однако, через 1 месяц после операции у пациентов с болезнью Грейвса показатель интенсивности (I_{max}) образования вторичных АФК зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови оставался пониженным, относительно контрольных значений, но повышался в сравнении с соответствующим значением I_{max}, выявленным до операции. Показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после оперативного лечения статистически значимо возрастал в 22,9 раза относительно контрольных показателей и в 1,4 раза, относительно значений, выявляемых при обследовании больных до операции.

Через 3 месяца после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса наблюдается статистически значимое снижение показателя интенсивности (I_{max}) образования вторичных АФК зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови в сравнении с соответствующим значением I_{max}, выявленным в контрольной группе, а также при обследовании больных до и через 1 месяц после тиреоидэктомии. В ходе зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике через 3 и 6 месяцев после оперативного лечения выявлено статистически значимое снижение показателя суммарного синтеза вторичных АФК (S) в сравнении с величинами, выявляемыми при обследовании больных до и через 1 месяц после тиреоидэктомии. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 3 и 6 месяцев после тиреоидэктомии показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов остается повышенным относительно контрольных значений. Установлено, что через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо замедляется скорость образования вторичных АФК нейтрофилов крови, как относительно контрольных значений, так и величин, выявляемых при обследовании больных до и через 1 и 3 месяца после тиреоидэктомии.

Индекс активации (Синд./Спонт.) люминол-зависимой хемилюминесценции у пациентов с болезнью Грейвса до и в динамике после оперативного лечения соответствует контрольным значениям, что отражает сохраненные функционально-метаболические возможности нейтрофилов крови.

Таким образом, анализ показателей генерации АФК в нейтрофилах периферической крови пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения показал, что через 6 месяцев после тиреоидэктомии у обследуемых больных происходит снижение интенсивности продукции, но при сохранении суммарного синтеза первичных АФК. Выявленные изменения в генерации пула вторичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса, которые сохраняются и через 6 месяцев после оперативного лечения отражают значительную, стойкую перестройку в кислород-зависимом метаболизме нейтрофилов периферической крови, которая свидетельствует об остаточных явлениях патологического процесса на системном уровне и может являться одним из векторов иммуотропной терапии заболевания.

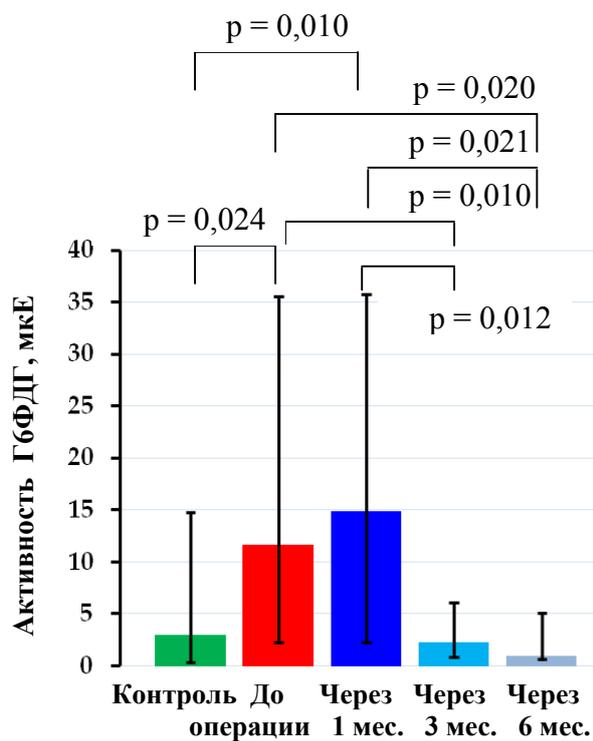
5.5. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Известно, что функциональное состояние любой клетки организма в значительной степени зависит от внутриклеточных метаболических процессов. Особенности метаболизма клеток в наибольшей степени отражают дегидрогеназы, характеризующие в основном два типа метаболических процессов, от которых зависит функционирование клетки, – энергетику и синтез [147]. Это связано с тем, что, во-первых, оксидоредуктазы, являясь основными переносчиками электронов, определяют интенсивность всех энергетических процессов в клетках, а, во-вторых, дегидрогеназы занимают ключевые позиции в системе внутриклеточного метаболизма и, соответственно, влияют на адаптивные возможности клеток [31, 59]. В свою очередь тиреоидные гормоны являются важнейшими модуляторами функциональной активности иммунных клеток, так как реализуют свое воздействие через рецепторный аппарат на систему внутриклеточного обмена и ряд важнейших биохимиче-

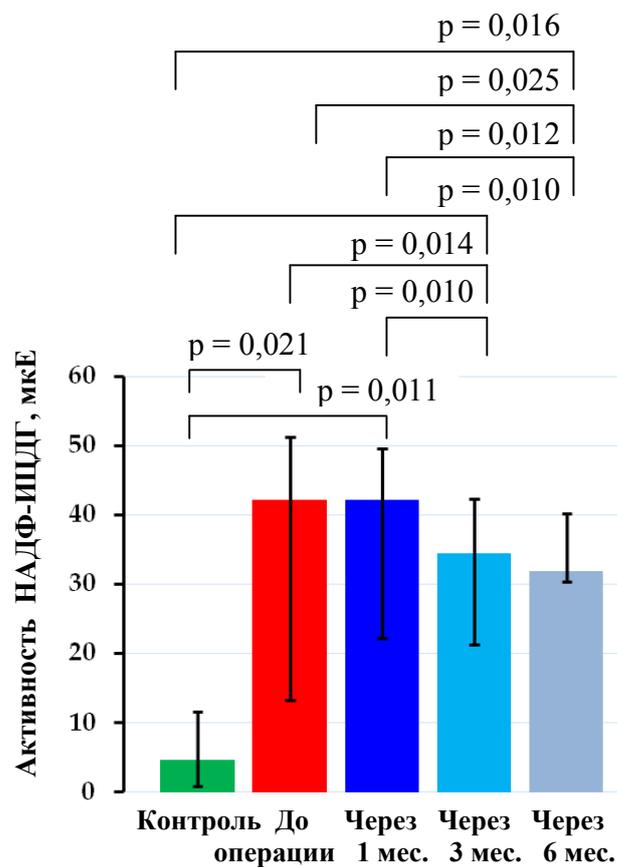
ских реакций клеток иммунной системы [202]. Ферменты, катализируя процессы внутриклеточного обмена, определяют способность нейтрофилов обеспечивать их участие в иммунном ответе [137, 179, 211]. Зависимость синтетических и энергетических процессов клеток иммунной системы от концентрации тиреоидных гормонов, а также сложные иммунитиреоидные взаимодействия позволяют использовать нейтрофилы периферической крови в качестве объекта исследований нарушений внутриклеточного обмена веществ в динамике различных методов лечения при болезни Грейвса [170]. При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах обнаружено, что у пациентов с болезнью Грейвса до и через 1 месяц после операции, относительно контрольных величин, выявляется повышение, соответственно, в 3,91 и 4,97 раз уровня активности Г6ФДГ (рисунок 12 а), от уровня которого зависит интенсивность ряда пластических процессов в митохондриальном компартменте нейтрофилов [330]. При последующем наблюдении, через 3 и 6 месяцев после операции, активность Г6ФДГ в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса снижается, относительно значений, выявляемых до и через 1 месяц после операции, и соответствует показателям, установленным в группе контроля.

Наиболее выраженные изменения у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения были установлены в активности НАДФ-ИЦДГ (рисунок 12 б). Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до операции в нейтрофилах крови в 9,1 раз повышена активность НАДФ-ИЦДГ в сравнении с показателями контрольной группы. Через месяц после оперативного лечения активность НАДФ-ИЦДГ в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса остается практически на том же уровне, что и до операции, и статистически значимо превышает уровень активности фермента, установленный в контрольной группе. Выявлено, что у пациентов с болезнью Грейвса активность НАДФ-ГДГ нейтрофилов до и через 1 и 3 месяца после оперативного лечения статистически значимо не различается с показателями контрольной группы (рисунок 12 в). Уровень НАДФ-МДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса соответствует показателям контрольной группы, как до, так и в динамике после тиреоидэктомии (рисунок 12 г).

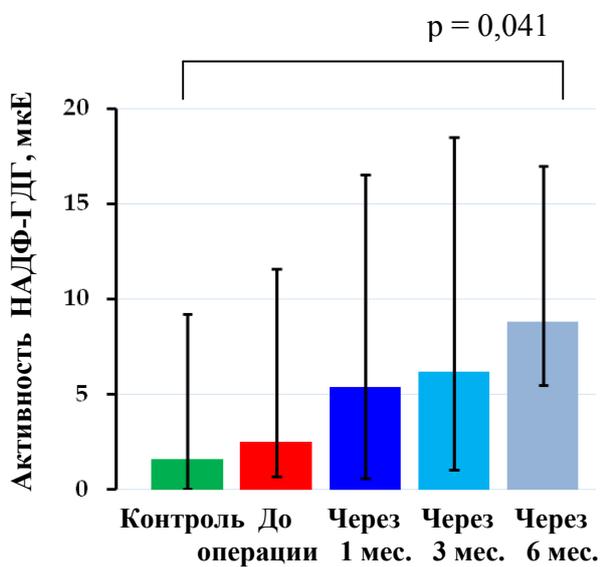
а)



б)



в)



г)

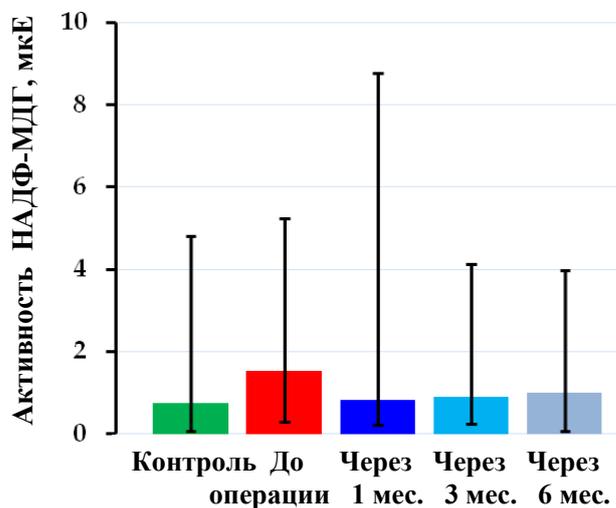


Рисунок 12 – Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Через 3 и 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса в нейтрофилах крови наблюдается некоторое снижение активности НАДФ-ИЦДГ в сравнении с уровнем данного фермента при определении до и через 1 месяц после операции, но остается статистически значимо повышенным в сравнении с показателями контрольной группы. Также, через 6 месяцев после операции в нейтрофилах крови пациентов с болезнью Грейвса в 6,4 раз повышается активность НАДФ-ГДГ, но при отсутствии статистически значимых отличий уровня НАДФ-МДГ в сравнении с уровнем активности данного фермента, установленным в контрольной группе. Повышение активности НАДФ-ИЦДГ и НАДФ-ГДГ, ферментов вспомогательных дегидрогеназных реакций ЦТК в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения может быть связано с субстратным дефицитом и компенсаторным усилением их активности в условиях низкого уровня НАДН [321].

Известно, что результатом реакции, катализируемой НАДФ-ИЦДГ является образование НАДФН, основная функция которого – участие в пластических процессах [31]. Кроме того, активность НАДФ-ГДГ катализирует энергетические и пластические реакции в клетках, продукты которых обеспечивают поступление в ЦТК субстратов с аминокислотного обмена [88]. Следовательно, повышение активности НАДФ-ИЦДГ и НАДФ-ГДГ в нейтрофилах периферической крови пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения может объясняться восстановлением уровня метаболизма клеток врожденного иммунитета после перенесенной иммунной атаки. Следует подчеркнуть, что если уровень ферментативной активности НАДФ-ИЦДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса повышается уже до операции, при обследовании больных в состоянии медикаментозного эутиреоза, то уровень НАДФ-ГДГ статистически значимо возрастает только через 6 месяцев после оперативного лечения. Кроме того, у пациентов с болезнью Грейвса в нейтрофилах крови в динамике после оперативного лечения меняется активность НАД-зависимых ферментов, функция которых в большей степени ориентирована на энергетические процессы.

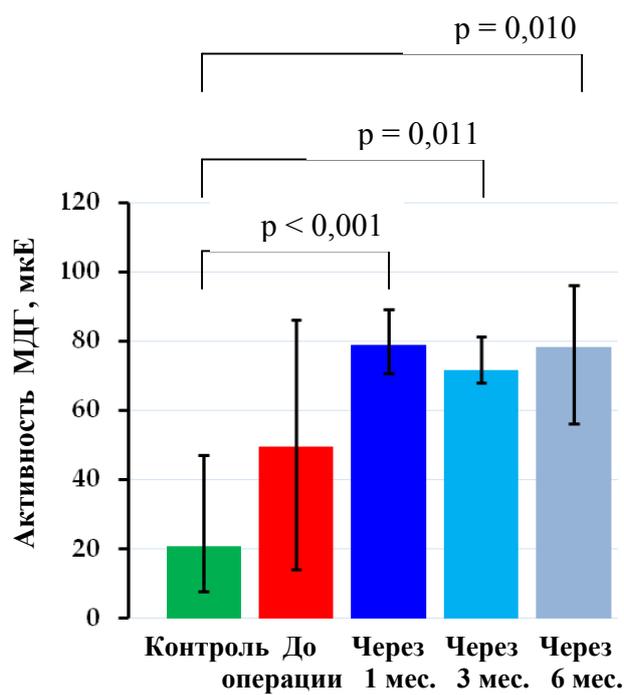
Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения в нейтрофилах крови статистически значимо, относительно контрольных величин, возростала активность ключевого фермента ЦТК, - МДГ (рисунок 13 а).

Следует отметить, что уровень активности НАД-зависимой реакции МДГ нейтрофилов у пациентов болезнью Грейвса до операции соответствует показателям активности ферменты, установленным в контрольной группе. Можно предположить, что возрастание активности МДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии связано с ингибированием аутоиммунного процесса и компенсаторным усилением энергетических процессов, направленных на восстановление клеточного метаболизма.

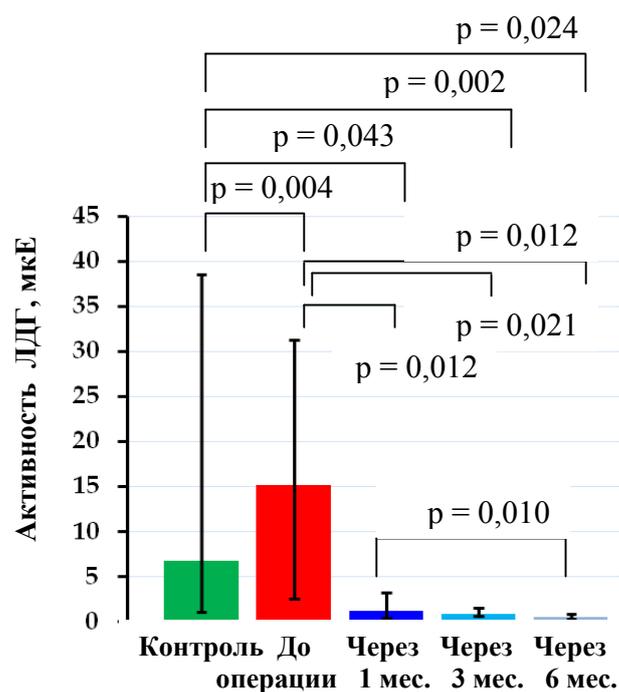
Уровень активности НАД-зависимой реакции ЛДГ в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса исходно повышен относительно контрольных величин и статистически значимо снижается вместе с увеличением времени наблюдения в послеоперационном периоде (рисунок 13 б). Причем, через 6 месяцев после оперативного лечения активность активности НАД-зависимой реакции ЛДГ в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса снижена в 11,2 раза относительно контрольных величин. Однако, активность НАД-зависимой реакции ГДГ в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения статистически значимо не изменялась относительно контрольных величин (рисунок 13 в). Оценивая активность НАД-ГДГ и НАДФ-ГДГ для прямой и обратной реакций, можно заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения отсутствие компенсаторного повышения интенсивности субстратного потока с ЦТК на аминокислотный обмен может быть связано с дефицитом кофакторов для них [31].

В то же время, у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимое повышение активности НАД-зависимой реакции ИЦДГ в нейтрофилах крови, в сравнении с показателями контрольной группы, установлено только при исследовании уровня данного фермента до и через 1 месяц после операции (рисунок 13 г).

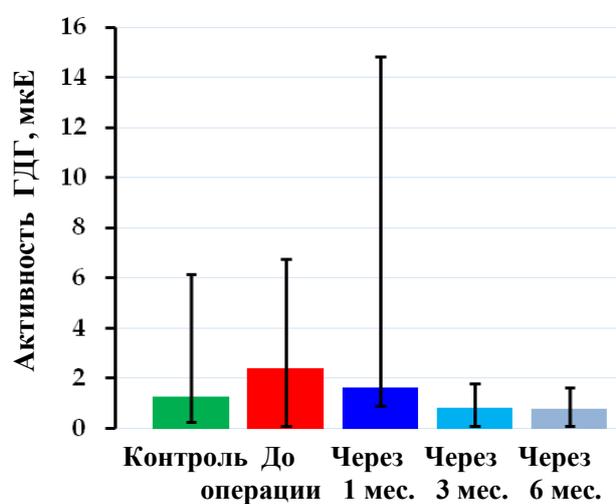
а)



б)



в)



г)

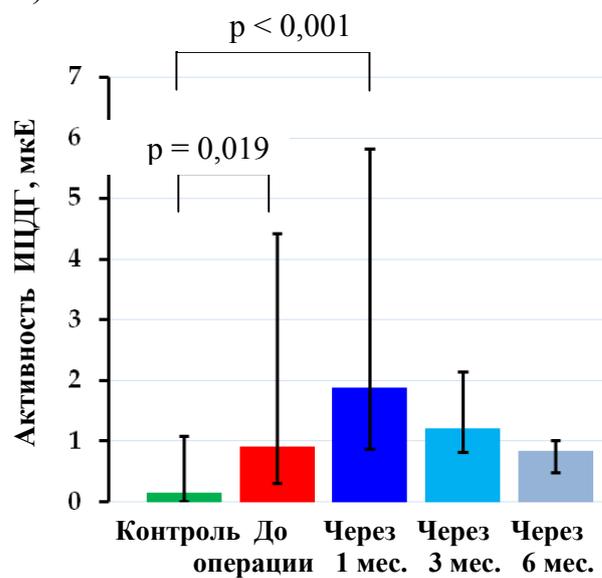


Рисунок 13 – Активность НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

При исследовании уровней активности НАДН- и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов обнаружено, что активность НАДН-МДГ у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения соответствует контрольным значениям (рисунок 14 а).

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после тиреоидэктомии в нейтрофилах крови статистически значимо, относительно контрольного диапазона, снижена активность НАДН-ЛДГ, но при отсутствии различий его уровня в зависимости от сроков обследования в послеоперационном периоде (рисунок 14 б). Причем, низкая активность НАДН-ЛДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса установлена и при обследовании больных до операции, в состоянии медикаментозного эутиреоза.

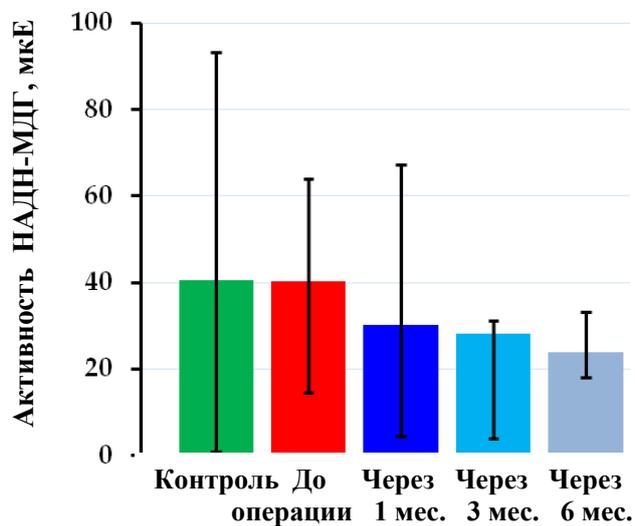
Выявленное статистически значимое снижение НАДН-ЛДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии, вероятно, отражает установленное ранее повышение базальной генерации вторичных АФК у обследуемых больных в динамике после оперативного лечения.

Известно, что ингибирующее влияние на интенсивность анаэробного метаболизма может оказывать, и синтезирующийся, в клетках иммунной системы H_2O_2 [33]. Следовательно, установленная сниженная активность НАДН-ЛДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения может быть связана с нарушениями в процессах свободнорадикального окисления клеток иммунной системы [139].

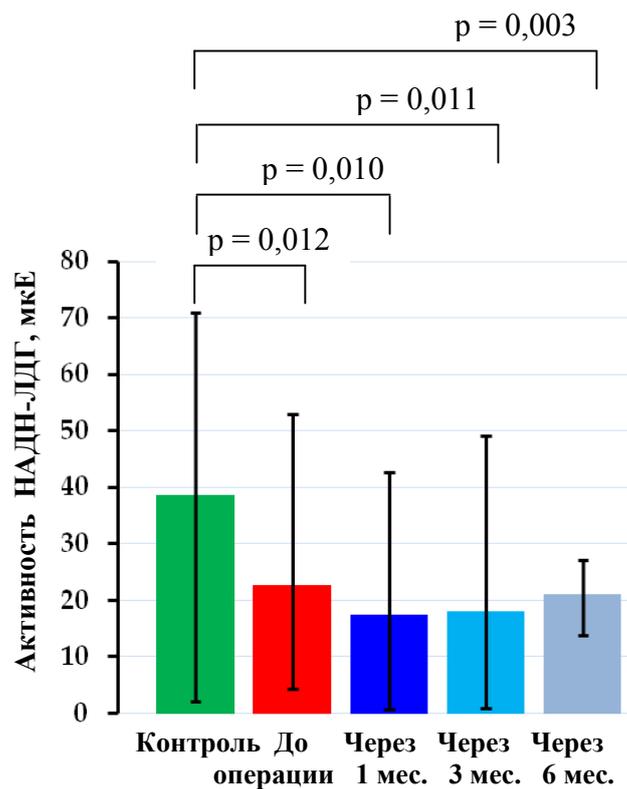
Однако, у пациентов с болезнью Грейвса уровень активности НАДН-ГДГ нейтрофилов статистически значимо не изменяется относительно показателей активности данного фермента, выявляемых в контрольной группе (рисунок 14 в).

Обращает на себя внимание, что при контрольном клинико-иммунологическом обследовании, через 6 месяцев после оперативного лечения, в нейтрофилах крови пациентов с болезнью Грейвса в 17,2 и 8,1 раза, соответственно, относительно контрольных величин, и значений, установленных при обследовании больных до операции, снижена активность НАДФН-ГДГ (рисунок 14 г).

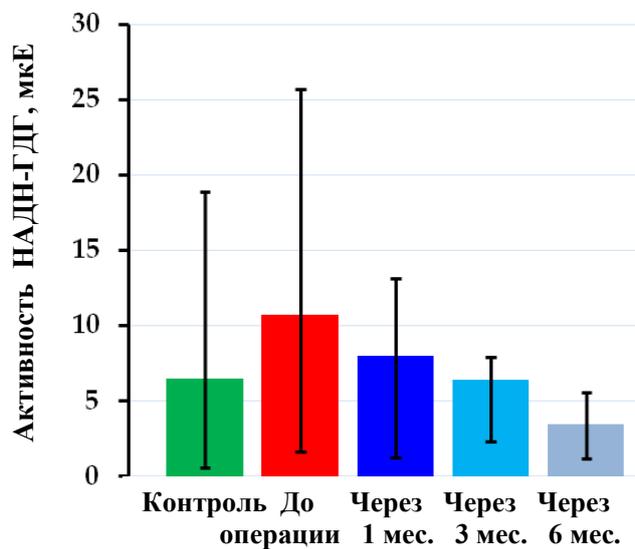
а)



б)



в)



г)

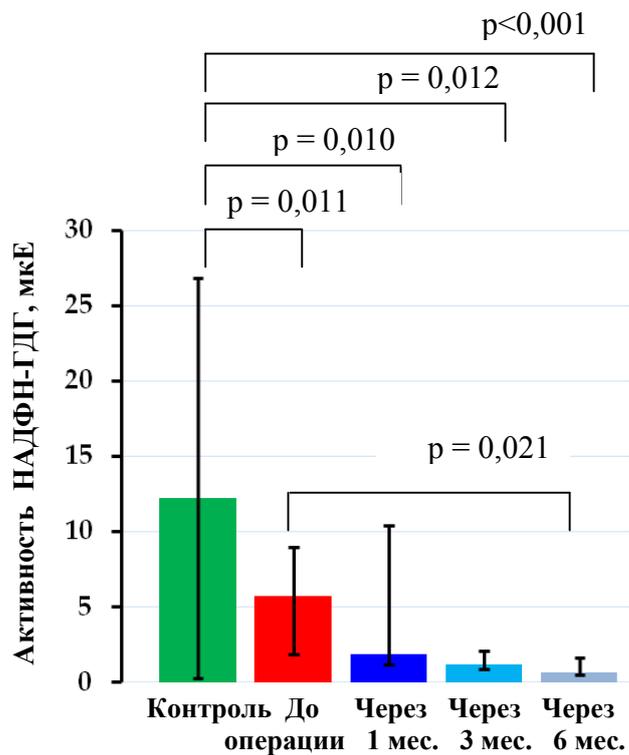


Рисунок 14 – Активность НАДН-и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Причем, активность НАДФН-ГДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижена относительно контрольных величин, как до, так и в динамике после тиреоидэктомии.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения активность НАДФН-ГДГ достигает минимального уровня, как относительно контрольных величин, так и значений активности фермента, установленных при обследовании больных до операции.

Выявленная низкая активность НАДФН-ГДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса после оперативного лечения отражает значительное снижение оттока субстратов с ЦТК на реакции аминокислотного обмена [31].

Однако, активность ГЗФДГ, в нейтрофилах крови пациентов с болезнью Грейвса, отражающая уровень переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза статистически значимо не изменялась, как до операции, так и при обследовании в динамике после оперативного лечения (рисунок 15 а).

Кроме того, в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения не установлено статистически значимого изменения активности главного фермента антиоксидантных внутриклеточных процессов, – ГР, как относительно контрольных величин, так и при обследовании больных в динамике после оперативного лечения (рисунок 15 б).

Учитывая установленную ранее повышенную базальную продукцию вторичных АФК и отсутствие компенсаторной активизации механизмов антиоксидантной защиты клетки, за счет увеличения уровня ГР нейтрофилов у обследуемых больных, как до, так и после тиреоидэктомии свидетельствует о том, что у пациентов с болезнью Грейвса нарушенные свободно-радикальные механизмы в клетках иммунной системы сохраняются, как при достижении медикаментозного эутиреоза, так и при устранении антигенного стимула, и развитии адаптивных изменений в системе иммунитета.

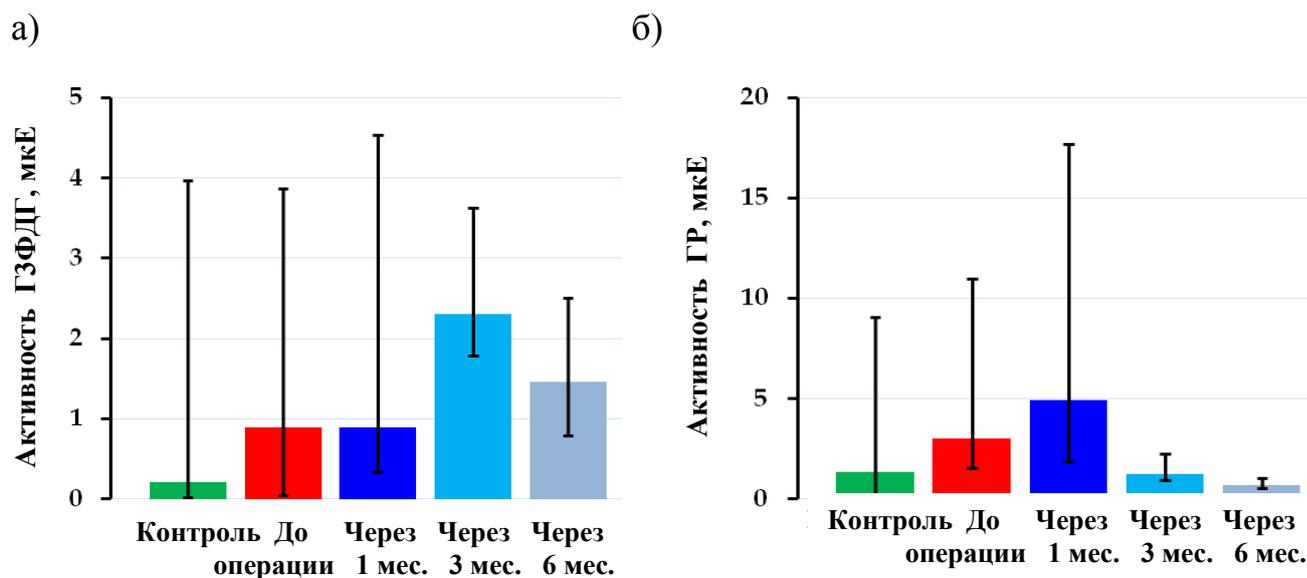


Рисунок 15 – Активность НАД-зависимой ГЗФДГ и ГР нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения

Установленная выраженная активация обменных процессов в митохондриальном компартменте за счет активации Г6ФДГ, ЛДГ, НАД- и НАДФ-зависимых ИЦДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса до оперативного лечения свидетельствует о стимуляции компенсаторных механизмов ингибирования перекисного окисления липидов, а также может быть обусловлена индукцией медикаментозного эутиреоза и долгосрочными, иммуномодулирующими влияниями длительной консервативной терапии тиамазолом.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения в нейтрофилах крови активность НАДФН-зависимого оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена остается низкой. Также, выявленное снижение активности аэробной и анаэробной реакций ЛДГ у пациентов с болезнью Грейвса в сравнении с уровнями активности данных ферментов, установленных в группе контроля, характеризует снижение интенсивности анаэробного гликолиза и, соответственно, функциональной активности нейтрофилов, в частности, способности к фагоцитозу и формированию внеклеточных ловушек нейтрофилов [199].

Полученные результаты позволяют заключить, что восстановление уровня большинства НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после оперативного лечения происходит через 6 месяцев после тиреоидэктомии. Однако, через 6 месяцев после оперативного лечения, на фоне повышенного суммарного уровня продукции вторичных АФК в нейтрофилах крови пациентов с болезнью Грейвса значительно понижена активность НАДФН-ГДГ и ЛДГ, что связано с низким оттоком интермедиатов для восстановления функциональной активности клеток иммунной системы.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ РАДИОНУКЛИДНОГО ЛЕЧЕНИЯ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ С ОЦЕНКОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

6.1. Клиническая характеристика и отбор пациентов с болезнью Грейвса на радионуклидное лечение

Отбор пациентов на радионуклидное лечение проводился согласно критериям стратификации лечебной тактики, установленным национальными клиническими рекомендациями по ведению пациентов с болезнью Грейвса [14]. Всем пациентам было проведено консервативное лечение тиамазолом и β -адреноблокаторами до устранения симптомов тиреотоксикоза. Пациентки проходили подготовку к процедуре РЙТ по стандартному протоколу, включающему соблюдение диеты с низким содержанием йода в течение четырех недель и отмену тиамазола за две недели до приема терапевтической активности ^{131}I . Для всех пациентов радионуклидное лечение проводилось впервые в качестве терапии второй линии.

В исследование включено 48 женщин с рецидивом болезни Грейвса, средний возраст $47,54 \pm 15,47$ лет, которые наблюдались в эндокринологическом центре КГБУЗ «Краевая клиническая больница» с дебюта заболевания. Медианы уровня антитиреоидных антител в дебюте болезни Грейвса у обследованных больных составили: антител к рТТГ – 12,81 (5,77; 26,58) МЕд/л, антител к ТПО – 92,63 МЕ/л (74,25; 166,32). На этапе планирования радионуклидного лечения все пациентки находились в состоянии медикаментозного эутиреоза: медианы уровня ТТГ, свТ3 и свТ4 на фоне приема поддерживающей дозы тиреостатика составили, соответственно, 0,11 мЕд/л (0,07; 0,87), 4,32 пмоль/л (3,31; 5,69) и 12,61 пмоль/л (10,51; 18,42).

Клинико-гормональная характеристика пациентов в динамике после радионуклидного лечения представлена в таблице 29.

Таблица 29 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	0,075 (0,001 – 0,45) p ₁ < 0,001	2,37 (0,91 – 5,71) p ₁ = 0,012 p ₂ = 0,021	2,36 (0,68 – 7,81) p _{1,2} < 0,001	2,12 (0,99 – 3,44) p _{1,2} < 0,001
свТЗ, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	5,28 (4,31 – 7,37) p ₁ < 0,001	2,52 (1,68 – 3,87) p ₁ = 0,011 p ₂ = 0,020	3,32 (2,51 – 4,44) p _{1,2,3} < 0,001	3,21 (2,21 – 4,25) p _{1,2,3} < 0,001
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	17,49 (12,87 – 21,44) p ₁ < 0,001	13,32 (10,18 – 18,05) p ₂ < 0,001	12,31 (9,56 – 14,61) p ₁ = 0,010 p ₂ = 0,015	13,22 (12,02 – 15,78) p ₂ < 0,001
Антитела к рТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	12,79 (5,76 – 26,57) p ₁ < 0,001	1,66 (0,42 – 4,54) p _{1,2} < 0,001	2,36 (1,32 – 3,72) p _{1,2,3} < 0,001	1,47 (0,86 – 2,91) p _{1,2,3,4} < 0,001

Продолжение таблицы 29

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Антитела к ТПО, мЕд/л	1,00 (0,00 – 3,00)	91,03 (76,23 – 165,41) $p_1 < 0,001$	23,05 (16,23 – 32,21) $p_{1,2} < 0,001$	16,21 (12,32 – 21,06) $p_{1,2,3} < 0,001$	12,32 (9,03 – 16,21) $p_{1,2,3,4} < 0,001$
Объем щитовидной железы, мл	9,91 (9,41 – 12,63)	21,05 (16,94 – 26,83) $p_1 < 0,001$	15,21 (10,51 – 18,03) $p_{1,2} < 0,001$	11,32 (9,23 – 16,03) $p_{1,2,3} < 0,001$	7,23 (5,21 – 9,12) $p_{1,2,3,4} < 0,001$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с контрольными величинами, p_2 — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p_3 — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p_4 — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

* Клинико-гормональные показатели до РЙТ соответствуют обследованию пациентов через две недели после отмены поддерживающей дозы тиамазола.

Общая продолжительность консервативного лечения тиамазолом до РЙТ составила 10 месяцев (8,75; 12,51). Однако, в исходе двухнедельной отмены тиамазола, перед приемом терапевтической активности ^{131}I тиреоидный статус пациентов с болезнью Грейвса соответствовал субклиническому гипертиреозу, с сохраняющимся высоким уровнем аутоантител к рТТГ, титр которых статистически значимо не отличался в сравнении со значением, установленным на этапе планирования радионуклидного лечения, в состоянии медикаментозного эутиреоза.

Через 1 месяц после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса медиана уровня ТТГ соответствовала эутиреоидному состоянию, а содержание аутоантител к рТТГ было статистически значимо снижено относительно значений, установленных до радионуклидного лечения, но выше контрольного диапазона. У 45 (93,75%) пациентов радионуклидное лечение оказалось эффективным и клинико-лабораторный симптомокомплекс пострадиационного гипотиреоза развился на 6 - 8 неделе от приема терапевтической активности ^{131}I , с последующим назначением заместительной терапии левотироксином натрия. При этом, у троих пациентов в течение недели после приема радиофармпрепарата развился транзиторный гипертиреоз, потребовавший назначения короткого курса терапии тиамазолом, с последующим развитием стойкого пострадиационного гипотиреоза.

К 3 месяцу наблюдения, после радионуклидного лечения, у всех обследуемых пациентов диагностирован пострадиационный гипотиреоз и инициирована заместительная терапия левотироксином натрия. Следует подчеркнуть, что через 3 месяца после приема терапевтической активности ^{131}I уровень свТЗ был статистически значимо ниже, в сравнении с контрольными величинами, а также со значениями, установленными до РЙТ, но выше, чем через 1 месяц до радионуклидного лечения.

Похожая закономерность у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения наблюдалась и в изменении титра антител к рТТГ в крови. Через 3 месяца после радионуклидного лечения уровень антител к рТТГ статистически значимо снижался в сравнении со значениями, установленными до приема терапевтической активности ^{131}I , но был выше, как относительно контроля, так и показателей, выявляемых через 1 месяц после радионуклидного лечения.

При контрольном клинико-гормональном обследовании, через 6 месяцев после радионуклидного лечения все пациенты находились в состоянии компенсированного пострадиационного гипотиреоза. Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса выявлено статистически значимое снижение титра антител к рТТГ в сравнении с его уровнем, установленным через 3 месяца после приема терапевтической активности ^{131}I .

В целом, за весь период наблюдения уровень антител к рТТГ статистически значимо снижался в сравнении с показателями, выявляемыми до РЙТ, но оставался повышенным относительно контрольных значений через 1 и 3 месяца, а также в исходе радионуклидного лечения. Похожие закономерности наблюдались и в снижении уровня антител к ТПО в динамике после радионуклидного лечения. Установлено, что медиана уровня антител к микросомальной фракции тиреоцитов у обследуемых пациентов с болезнью Грейвса, установленная исходно, на этапе планирования радионуклидного лечения, а также через две недели после отмены тиамазола, до приема терапевтической активности ^{131}I , статистически значимо не различались между собой. Выявлено прогрессивное снижение циркулирующих антител к ТПО в крови пациентов с болезнью Грейвса через 1, 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения. Следует подчеркнуть, что в исходе радионуклидного лечения в крови пациентов с болезнью Грейвса определялся минимальный титр антител, как к рТТГ, так и к микросомальной фракции тиреоцитов за весь период наблюдения.

Однако, через 6 месяцев после радионуклидного лечения уровень антител к рТТГ и ТПО оставался статистически значимо повышен относительно контрольных показателей. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, которые демонстрируют, что положительный титр антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса может сохраняться длительное время после тиреоидэктомии и лечения ^{131}I [248]. Выявлено статистически значимое уменьшение объема щитовидной железы вместе с увеличением продолжительности времени от момента приема терапевтической активности ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса. Причем, в исходе радионуклидного лечения объем щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса был статистически значимо ниже, чем в группе контроля.

Таким образом, радионуклидное лечение оказалось эффективным у 48 (100%) пациентов с болезнью Грейвса. Через 6 месяцев после РЙТ у всех обследуемых пациентов диагностировался компенсированный пострадационный гипотиреоз. Сохраняющийся положительный титр антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения подтверждает ключевую роль рТТГ, как основной антигенной детерминанты заболевания.

6.2. Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

Радионуклидное лечение при болезни Грейвса основано на способности к захвату и накоплению ^{131}I клетками щитовидной железы [272]. При распаде изотопа йода (^{131}I) образуются β -частицы, которые вызывают деструкцию тиреоцитов и последующее развитие пострадационного гипотиреоза [21]. Лечение радиоактивным йодом вызывает хромосомные абберации иммуноцитов, повреждение ДНК тиреоцитов, высвобождение тиреоидных аутоантигенов, дополнительно стимулирующих реактивность иммунной системы больных, включая и реактивацию аутоиммунного воспаления [94, 156, 281].

Наиболее чувствительными клетками иммунной системы к воздействию ^{131}I являются Т- и В-лимфоциты, гибель которых происходит в течение суток после радионуклидного воздействия [124]. Гибель иммуноцитов, находящихся в состоянии покоя, происходит путем апоптоза, в свою очередь лимфоциты, которые выжили и вступили в иммунный ответ гибнут в митотическую фазу жизненного цикла клетки [302].

Иммунотиреоидные взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками и аутоактивированными Th-клетками и В-лимфоцитами в ткани щитовидной железы при болезни Грейвса способствуют выработке провоспалительных цитокинов, и TSAb, которые участвуют в повреждении и дисфункции щитовидной железы, и играют решающую роль в иммунопатогенезе заболевания [203]. Недостаточная изученность иммунопатогенетических механизмов, приводящих к индукции рецидива гипертиреоза, спонтанного гипо- и эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса, а также длительная циркуляция антител к рТТГ после радионуклидного лечения ограничивают разработку таргетной терапии и определяют направление дальнейших иммунобиологических исследований заболевания.

В связи с этим, в настоящее время, актуальными считаются исследования влияния терапии ^{131}I на клеточные субпопуляции Т- и В-клеток, не только участвующих в иммунной регуляции механизмов рецидива болезни Грейвса, но и яв-

ляющихся специфически патологическими субпопуляциями клеток иммунной системы, дефект которых сохраняется и после радикального воздействия ^{131}I , и может являться потенциальной мишенью для разработки иммуотропной терапии заболевания. Для оценки особенностей популяционного и субпопуляционного состава, сигнального взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, а также определения ключевых иммунологических механизмов прогрессирования аутоиммунного процесса у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения исследовали фенотипический состав лимфоцитов периферической крови в разные периоды заболевания: в день проведения РЙТ, до приема удельной активности ^{131}I , и далее в динамике, через 1, 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения. Содержание CD3^+ -лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлено в таблице 30. При изучении фенотипического состава Т-лимфоцитов (CD3^+) периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса установлены изменения в содержании Тh-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$) в динамике после радионуклидного лечения. До радионуклидного лечения в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса повышен процентный уровень общей фракции Тh-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$), при соответствии абсолютного общего числа Т-лимфоцитов (CD3^+) контрольным показателям. Установлено, что через месяц после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса происходит еще большее статистически значимое увеличение процентного числа общей фракции Тh-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$) в крови, как относительно контрольных показателей, так и значений, выявляемых до радионуклидного лечения. Однако, через 3 месяца после РЙТ процентный уровень общей фракции Тh-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$) у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижен, относительно величин, установленных при обследовании больных до и через 1 месяц после РЙТ, но соответствует показателям контрольной группы. Через 6 месяцев после радионуклидного лечения процентный уровень Тh-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$) в крови у пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольным значениям. Количество цитотоксических Т-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+$) у пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольным величинам, как до, так и на протяжении всего пострadiационного периода наблюдения.

Таблица 30 – Содержание CD3⁺-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,01 (1,68 – 2,33)	2,11(1,61 – 2,67)	2,32 (1,63– 2,45) p ₁ = 0,019	2,11 (1,21 – 2,32)	1,90 (1,72 – 2,43) p ₁ < 0,001
CD3 ⁺ , %	73,81 (68,01 – 77,83)	75,51 (71,31 – 77,82)	76,23 (68,61 – 79,63)	75,91 (68,42 – 80,03)	74,12 (69,82 – 76,84)
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	2,01 (1,68 – 2,32)	1,61 (1,17 – 1,95)	1,53(1,25 – 1,72)	1,39 (1,21 – 1,76)	1,43 (1,19 – 1,69)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,72 (37,81 – 48,01)	47,23 (39,91 – 52,32) p ₁ = 0,021	51,03 (42,32 – 53,01) p _{1,2} < 0,001	44,23 (41,4 – 51,42) p _{2,3} < 0,001	43,27 (39,81 – 50,11) p _{2,3} < 0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	28,71 (23,72 – 34,32)	29,32 (23,11 – 31,72)	27,91 (25,82 – 32,23)	28,12 (24,73 – 31,23)	27,01 (23,32 – 31,73)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,43 (1,04 – 1,95)	1,81 (1,54 – 2,16) p ₁ = 0,032	1,64 (1,45 – 1,98)	1,67 (1,55 – 1,74)	1,66 (1,24 – 2,22)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	0,38 (0,32 – 0,85)	0,49 (0,37 – 1,06)	0,64 (0,45 – 0,73)	0,46 (0,37 – 0,57)	0,61 (0,42 – 0,95)
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ , %	0,41 (0,35 – 0,96)	3,57 (2,41 – 4,52) p ₁ < 0,001	3,05 (1,94 – 3,67) p ₁ < 0,001	3,61 (2,34 – 4,03) p ₁ < 0,001	2,21 (2,15 – 3,71) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

У пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения наблюдалось изменение соотношения $CD4^+/CD8^+$, показатель которого был статистически значимо выше относительно контроля. Однако, при обследовании больных через 1, 3 и 6 месяцев после приема терапевтической активности ^{131}I соотношение $CD4^+/CD8^+$ соответствовало контрольному диапазону и статистически значимо не изменялось в зависимости от сроков обследования в пострadiационном периоде. Следует подчеркнуть, что наиболее выраженные изменения у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения были выявлены при изучении содержания дубль-негативных Т-клеток ($CD3^+CD4^-CD8^-$). Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса процентное число дубль-негативных Т-клеток ($CD3^+CD4^-CD8^-$) статистически значимо выше в сравнении с показателями контрольной группы, как до, так и через 1, 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения, но при отсутствии различий в зависимости от сроков обследования после радионуклидного лечения. При этом, процентное число дубль-позитивных Т-клеток ($CD3^+CD4^+CD8^+$) у пациентов с болезнью Грейвса на протяжении всего периода наблюдения соответствует показателям, выявляемым у лиц контрольной группы.

Содержание Treg в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлено в таблице 31. Установлены значительные изменения в содержании Treg в крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от сроков наблюдения после радионуклидного лечения. У пациентов с болезнью Грейвса выявлено изменение содержания общего числа Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) в периферической крови в динамике после радионуклидного лечения. Установлено снижение абсолютного уровня общей фракции Treg, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения, при отсутствии статистически значимых различий в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде. Однако, через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса выявлено статистически значимое снижение абсолютного числа общей фракции Treg, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании больных до радионуклидного лечения.

Таблица 31 – Содержание регуляторных Т-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , 10 ⁹ /л	0,06 (0,05 – 0,12)	0,03 (0,01 – 0,07) p ₁ < 0,001	0,02 (0,01– 0,06) p ₁ < 0,001	0,02 (0,01 – 0,05) p ₁ < 0,001	0,010 (0,007 – 0,04) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,008
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	1,55 (0,83 – 3,09)	1,33 (0,69 – 3,03)	1,36 (0,65 – 2,56)	0,95 (0,79 – 1,58) p ₁ < 0,001	1,01 (0,77 – 2,04) p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,015
Treg CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	0,36 (0,26 – 0,69)	0,12 (0,04 – 0,22) p ₁ < 0,001	0,14 (0,06 – 0,23) p ₁ < 0,001	0,003 (0,0007 – 0,005) p _{1,2,3} < 0,001	0,001 (0,0006 – 0,016) p _{1,2,3} < 0,001

Продолжение таблицы 31

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
Treg CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	0,61 (0,32 – 0,89)	0,71 (0,58 – 0,99)	0,72 (0,40 – 0,95)	0,50 (0,34 – 0,60)	0,82 (0,50 – 1,08)
Treg CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	0,41 (0,21 – 0,55)	0,47 (0,29 – 0,63)	0,41 (0,27 – 0,53)	0,43 (0,25 – 0,57)	0,15 (0,12 – 0,32) p ₁ = 0,010 p ₂ = 0,018 p ₃ = 0,030 p ₄ = 0,021
Treg CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	0,14 (0,12 – 0,21)	0,021 (0,009 – 0,03) p ₁ < 0,001	0,030 (0,01 – 0,05) p ₁ < 0,001	0,002 (0,001 – 0,005) p _{1,2,3} < 0,001	0,001 (0,0007 – 0,003) p _{1,2,3} < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

При этом, процентное число Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) у пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольному диапазону до и через 1 месяц после РЙТ, но статистически значимо снижается через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения. Причем, через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса процентный уровень общей фракции Treg статистически значимо снижается, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных до радионуклидного лечения.

При изучении отдельных субпопуляций Treg установлено, что процентный уровень наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо понижен относительно контрольного диапазона, как до РЙТ, так и в динамике после радионуклидного лечения. Однако, через 3 и 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса процентное число наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg в крови значительно снижается и относительно значений, выявляемых при обследовании в период до и через 1 месяц после радионуклидного лечения ($\chi^2 = 8,62$, $p = 0,035$). Относительное содержание Treg центральной памяти ($CD45R0^+CD62L^+$) соответствует контрольным величинам на протяжении всего периода наблюдения и не изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострадиационном периоде.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса процентное число Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) статистически значимо не изменяется в сравнении с показателями контрольной группы, как при обследовании больных до, так и через 1 и 3 месяца после радионуклидного лечения. Однако, через 6 месяцев после радионуклидного лечения процентный уровень Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) статистически значимо снижен, как относительно показателей контрольной группы, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения. Причем, установлено, что уровень Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) у пациентов с болезнью Грейвса снижается последовательно в динамике после радионуклидного лечения ($\chi^2 = 10,93$, $p = 0,012$).

Выявлено, что через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижено, относительно контрольных величин, абсолютное и процентное число общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), процентное содержание наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, а также Treg эффекторной ($CD45R0^+CD62L^-$) памяти, но при соответствии уровня Treg центральной памяти ($CD45R0^+CD62L^+$) контрольному диапазону.

Содержание Th-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного представлено в таблице 32. Детальный анализ клеточных субпопуляций Th-клеток, находящихся на разных этапах дифференцировки, у пациентов с болезнью Грейвса позволил установить изменения в их количественном составе, которые зависят от сроков наблюдения в пострadiационном периоде.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса абсолютное число Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) соответствует контрольному диапазону на протяжении всего пострadiационного периода. Обнаружено, что у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения статистически значимо повышено процентное число наивных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^+$) относительно контрольных значений. Однако, через 1, 3 и 6 месяцев после приема терапевтической активности ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание наивных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^+$) восстанавливается до контрольных величин. Причем, процентно число наивных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^+$) у пациентов с болезнью Грейвса через 3 и 6 месяцев после РЙТ статистически значимо ниже, в сравнении с показателями, установленными при обследовании больных до радионуклидного лечения.

Выявлено, что у пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание Th-клеток центральной памяти ($CD3^+CD4^+CD45R0^+CD62L^+$) статистически значимо возрастает относительно контрольного диапазона, как до РЙТ, так и через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения, но не изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде.

Таблица 32 – Содержание Th-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁–Q₃)

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,96 (0,82 – 1,18)	0,99 (0,68 – 1,23)	0,91 (0,85 – 1,12)	0,88 (0,71 – 1,04)	0,87 (0,73 – 1,02)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	15,21 (11,83 – 21,61)	24,45 (16,72 – 27,29) p ₁ = 0,013	22,16 (15,15 – 26,41)	17,29 (15,27 – 17,95) p ₂ = 0,042	16,18 (10,61 – 23,41) p ₂ = 0,043
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	12,32 (10,81 – 14,51)	15,82 (10,57 – 20,51) p ₁ = 0,011	14,56 (12,50 – 15,92) p ₁ = 0,021	14,48 (13,28 – 18,35) p ₁ = 0,010	14,78 (12,25 – 17,26) p ₁ = 0,012
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	10,02 (8,52 – 13,42)	10,40 (7,64 – 12,51)	10,09 (9,33 – 10,78)	10,73 (9,60 – 14,12)	10,01 (8,07 – 15,32)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	1,05 (0,64 – 1,77)	0,90 (0,72 – 1,12)	1,45 (0,67 – 1,77)	1,22 (0,76 – 2,55) p ₂ = 0,043	1,13 (0,37 – 3,02)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Процентное содержание Th-клеток эффекторной памяти ($CD3^+CD4^+CD45R0^+CD62L^-$) и терминально-дифференцированных ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^-$) Th-клеток у пациентов с болезнью Грейвса, как исходно, так и в динамике после радионуклидного лечения соответствует контрольному диапазону, и не изменяется в зависимости от сроков обследования в пострадиационном периоде. Выявлено статистически значимое транзиторное увеличение процентного содержания терминально-дифференцированных ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^-$) Th-клеток у пациентов с болезнью Грейвса, через 3 месяца после РЙТ, относительно значений, установленных при обследовании больных до радионуклидного лечения, но при их соответствии показателям контроля, указывает на долгосрочные влияния ^{131}I на иммунную систему больных.

Таким образом, через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса определяется статистически значимо повышенный уровень Th-клеток центральной памяти ($CD3^+CD4^+CD45R0^+CD62L^+$), при соответствии других исследуемых субпопуляций Th-клеток контрольному диапазону, что, может быть проявлением, как регуляторного дефекта Treg, в отношении их недостаточной супрессорной функции на Th-клетки, так и с особенностью циркуляции Th-клеток центральной памяти ($CD3^+CD4^+CD45R0^+CD62L^+$) в периферическом кровотоке, связанной с их длительным периодом жизненного цикла [33].

Количество цитотоксических T-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлено в таблице 33.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса абсолютное число цитотоксических T-клеток ($CD3^+CD8^+$) статистически значимо снижается относительно контрольных величин, но не изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострадиационном периоде. При изучении субпопуляционного состава цитотоксических T-клеток крови у пациентов с болезнью Грейвса наиболее выраженные изменения установлены при обследовании больных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Таблица 33 – Количество цитотоксических Т-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,71 (0,57 – 0,77)	0,46 (0,32 – 0,68) p ₁ = 0,014	0,39 (0,35– 0,56) p ₁ = 0,004	0,47 (0,26–0,69) p ₁ = 0,043	0,45 (0,37 – 0,53) p ₁ = 0,007
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁺ , %	8,46 (5,74 – 13,36)	12,27 (10,53 – 14,77) p ₁ = 0,026	12,73 (9,66 – 16,42) p ₁ = 0,027	9,57 (4,72 – 13,93)	6,48 (4,42 – 8,64) p ₂ = 0,021
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺ , %	2,07 (1,53 – 3,16)	1,96 (1,66 – 2,57)	2,10 (1,33 – 2,82)	1,92 (1,58– 2,61)	2,08 (1,69 – 2,48)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻ , %	7,17 (6,01 – 14,51)	6,28 (4,66 – 7,02) p ₁ = 0,048	6,01 (3,32 – 6,84) p ₁ = 0,023	6,68 (5,38 – 7,77)	6,53 (3,76 – 10,88)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁻ , %	7,78 (5,63 – 14,72)	6,38 (3,93 – 9,94)	7,02 (4,38 – 10,81)	7,09 (6,36 – 11,78)	9,43 (5,71 – 13,02)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до и через 1 месяц после РЙТ статистически значимо повышено процентное число наивных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) цитотоксических Т-клеток. В то же время, у пациентов с болезнью Грейвса до и через 1 месяц после РЙТ выявлено статистически значимое снижение процентного числа цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^-$) в сравнении с контрольными показателями. Следует отметить, что через 1 месяц после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса содержание наивных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) и цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^-$) оставалось практически на том же уровне, как и до радионуклидного лечения. Однако, через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса процентное число наивных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) и цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^-$) восстанавливается до контрольных величин.

Выявлено, что у пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание цитотоксических Т-клеток центральной памяти ($CD3^+CD8^+CD45R0^+CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^-$) цитотоксических Т-клеток соответствует контрольным величинам, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения, и не изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострадиационном периоде. Установлено, что через 3 месяца после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса процентное содержание всех субпопуляций цитотоксических Т-клеток соответствует контрольным значениям, но при статистически значимом снижении их абсолютного числа ($CD3^+CD8^+$).

Установлено, что через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса происходит восстановление всех процентных субпопуляций цитотоксических Т-клеток, находящихся на разных этапах дифференцировки, до контрольных величин, но выявлялся статистически значимо пониженным абсолютный уровень общей фракции цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) в сравнении с показателями группы контроля.

Субпопуляционный состав В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлен в таблице 34.

При изучении гуморального звена иммунитета в динамике после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса было установлено соответствие большинства субпопуляций В-лимфоцитов контрольному диапазону. Обнаружено, что абсолютное и процентное число В-лимфоцитов ($CD19^+$) у пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольному диапазону, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения, и не изменяется в зависимости от сроков обследования в пострadiaционном периоде. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса установлено статистически значимое снижение процентного числа В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе, на протяжении всего пострadiaционного периода наблюдения. Причем, низкое процентное число В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) относительно контрольных величин, у пациентов с болезнью Грейвса выявлялось и при обследовании до радионуклидного лечения, в состоянии медикаментозного эутиреоза, что, свидетельствует об иммунопатогенетическом значении данной субпопуляции В-клеток.

Кроме того, у пациентов с болезнью Грейвса выявлено статистически значимое транзитное снижение наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-$) через 3 месяца после приёма терапевтической активности ^{131}I , в сравнении с показателями, выявляемыми при обследовании больных до РЙТ, но при соответствии их уровня контрольному диапазону. Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса установлено только статистически значимое снижение процентного содержания В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) относительно контрольных величин.

Таким образом, через 6 месяцев после радионуклидного лечения процентное и абсолютное содержание общей фракции В-лимфоцитов ($CD19^+$), процентный уровень В1-клеток ($CD19^+CD5^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-$) и наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-$) в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса соответствует контрольным показателям, но при снижении числа В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$).

Таблица 34 – Субпопуляционный состав В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n= 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺ , %	11,21 (10,03 – 14,61)	10,87 (9,38 – 11,77)	11,09 (9,32 – 14,29)	9,71 (7,96 – 12,53)	11,84 (8,61 – 14,23)
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,24 (0,22 – 0,34)	0,25 (0,16 – 0,39)	0,23 (0,14 – 0,37)	0,24 (0,15 – 0,38)	0,23 (0,13 – 0,36)
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,77 (1,22 – 2,61)	1,80 (1,43 – 2,68)	2,01(1,38 – 3,14)	1,44(0,83 – 2,21)	1,83 (1,07 – 2,23)
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	9,45 (8,12 – 11,01)	8,58 (7,46 – 9,98)	8,42 (7,93 – 10,76)	7,78 (6,62 – 10,81)	9,73 (7,41 – 12,13)
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	8,03 (5,91 – 11,52)	9,18 (7,25 – 10,26)	8,43 (6,93 – 11,77)	7,14 (6,45 – 9,83) p ₂ = 0,035	9,77 (6,71 – 12,42)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	3,21 (2,12 – 4,42)	1,93 (1,41 – 2,78) p ₁ = 0,004	1,81 (1,36 – 3,46) p ₁ = 0,006	2,23 (1,71 – 2,69) p ₁ = 0,024	1,83 (1,67 – 2,29) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Наиболее выраженные изменения в гуморальном звене иммунитета после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса установлены в процентном содержании активированных В-клеток в крови. Процентное число активированных В-клеток у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлено в таблице 35.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения в крови статистически значимо повышено количество активированных В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) и наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$), но при снижении процентного числа активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+23^+$), и при соответствии процентного числа общей фракции активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$) контрольному диапазону. Но, уже через 1 месяц после РЙТ количество активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$) у больных в крови статистически значимо снижается, как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявляемых до радионуклидного лечения ($\chi^2=8,10$, $p = 0,042$). Через 1 и 3 месяца после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижается процентное число активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) и наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$), как относительно контроля, так и значений выявляемых при обследовании больных до радионуклидного лечения. Установлено, что процентное число активированных В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) снижается уже через 1 месяц после РЙТ, как относительно контрольного уровня, так и исходных значений, при этом обнаружено дальнейшее последовательное понижение количества этих клеток в крови через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения ($\chi^2=10,20$, $p = 0,015$). Через 6 месяцев после РЙТ у больных статистически значимо снижено процентное содержание активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$), В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$), В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$), и наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$), как относительно контрольного диапазона, так и значений, установленных при обследовании больных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Таблица 35 – Количество активированных В-клеток в крови (в %) у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁ – Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺ CD23 ⁺	1,51 (0,62 – 6,13)	2,18 (0,81 – 3,46)	0,23 (0,06 – 2,86) p ₁ = 0,016 p ₂ = 0,024	0,13 (0,04 – 1,64) p ₁ = 0,001 p ₂ = 0,008	0,06 (0,02 – 0,32) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,034
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺	0,24 (0,08 – 0,62)	0,14 (0,04 – 0,74) p ₁ = 0,013	0,13 (0,04 – 0,72) p ₁ = 0,009	0,07 (0,03 – 0,52) p _{1,2,3} < 0,001	0,03 (0,01 – 0,13) p _{1,2,3} < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD23 ⁺	0,24 (0,14 – 4,44)	2,02 (0,79 – 3,03) p ₁ = 0,010	0,11 (0,06–1,24) p _{1,2} < 0,001	0,05 (0,01 – 0,92) p _{1,2,3} < 0,001	0,03 (0,02 – 0,11) p _{1,2,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD23 ⁺	0,49 (0,09 – 7,76)	2,19 (1,41 – 3,93) p ₁ = 0,018	0,11 (0,03 – 1,38) p _{1,2} < 0,001	0,04 (0,02 – 0,79) p _{1,2} < 0,001	0,02 (0,01 – 0,07) p ₁ = 0,024 p _{2,3} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺	0,40 (0,20 – 0,92)	0,09 (0,03 – 0,25) p ₁ < 0,001	0,15 (0,06 – 0,25) p ₁ = 0,001	0,08 (0,03 – 0,13) p ₁ < 0,001	0,04 (0,01– 0,16) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Следует подчеркнуть, что процентное число активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) у пациентов с болезнью Грейвса снижено, в сравнении с показателями, установленными в контрольной группе, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения.

Уровни экспрессии MFI CD23 на основных субпопуляциях В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлены в таблице 36. При клинико-иммунологическом обследовании в динамике после радионуклидного лечения было установлено, что уровень экспрессии активационного маркера MFI CD23 на основных популяциях В-лимфоцитов крови у пациентов с болезнью Грейвса, который отражает плотность экспрессируемых активационных молекул на мембране клетки, изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде. Установлено, что до приёма терапевтической активности ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса выявлялось статистически значимое повышение экспрессии маркера MFI CD23 на общей фракции В-клеток ($CD19^+$), но при снижении уровня его экспрессии на В2-клетках ($CD19^+CD5^-$). При этом, у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках ($CD19^+CD5^+$), В-клетках памяти ($CD19^+CD27^+$) и наивных В-клетках-памяти ($CD19^+CD27^-$) в периферической крови соответствовал контрольным показателям, что может являться одним из иммуномодулирующих влияний предшествующей консервативной терапии тиамазолом.

Через 1 месяц после радионуклидного лечения в крови пациентов с болезнью Грейвса происходило транзиторное, статистически значимое повышение общей популяция В-лимфоцитов ($CD19^+$), экспрессирующей активационный маркер MFI CD23, как относительно контрольного диапазона, так и значений, установленных при обследовании больных до РЙТ, но при снижении уровня экспрессии данного маркера на наивных В-клетках ($CD19^+CD27^-$). Установлено, что через 1 месяц после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо, относительно контрольных величин, снижается уровень экспрессии MFI CD23 на В2-клетках ($CD19^+CD5^-$).

Таблица 36 – Уровни экспрессии CD23 (MFI) на основных субпопуляциях В-лимфоцитов (в о.е.) у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Параметры	Контроль n = 85 1	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ, n = 48			
		До РЙТ 2	Через 1 мес. 3	Через 3 мес. 4	Через 6 мес. 5
CD19 ⁺	3,78 (3,31 – 4,77)	5,55 (4,34 – 7,03) p ₁ = 0,022	7,26 (4,77 – 8,51) p _{1,2} < 0,001	5,19 (0,21 – 7,56)	5,81 (0,32 – 6,91) p ₁ = 0,012
CD19 ⁺ CD5 ⁺	6,58 (5,91 – 8,46)	6,41 (5,21 – 8,78)	5,97 (0,76 – 8,32)	0,03 (0,01 – 6,88) p _{1,2,3} < 0,001	6,31 (0,39 – 7,32) p ₄ < 0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻	5,28 (5,07 – 5,55)	4,72 (0,76 – 4,89) p ₁ = 0,009	4,24 (0,95 – 6,65) p ₁ = 0,010	0,09 (0,13 – 6,48) p ₁ = 0,021 p _{2,3} < 0,001	0,05 (0,01 – 5,76) p ₁ = 0,037 p _{2,3,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁻	4,41 (4,13 – 4,61)	2,05 (0,29 – 4,61)	0,05 (0,01 – 3,52) p _{1,2} < 0,001	0,76 (0,23 – 2,51) p ₁ = 0,022	0,09 (0,03 – 5,46) p _{1,2,4} < 0,001
CD19 ⁺ CD27 ⁺	6,19 (5,62 – 6,85)	6,63 (5,82 – 8,78)	8,39 (5,23 – 9,84)	5,92 (0,16 – 8,02)	7,07 (0,61 – 7,41)

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с контрольными величинами, p₂ — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p₃ — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p₄ — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Однако, через 1 месяц после радионуклидного лечения уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках ($CD19^+CD5^+$) и В-клетках памяти ($CD19^+CD27^+$) в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса соответствовал контрольному диапазону. Наиболее выраженные изменения в экспрессии активационного маркера MFI CD23 у пациентов с болезнью Грейвса были выявлены через 3 месяца после радионуклидного лечения. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после радионуклидного лечения в периферической крови снижен уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках ($CD5^+CD23^+$), В2-клетках ($CD5^-CD23^+$), а также наивных В-клетках ($CD19^+CD27^-$) в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе. Причем, уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках ($CD5^+CD23^+$) и В2-клетках ($CD5^-CD23^+$) у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после РЙТ статистически значимо снижен, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании больных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения. Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после радионуклидного лечения уровень экспрессии MFI CD23 на общей фракции В-лимфоцитов ($CD19^+$) и В-клетках памяти ($CD19^+CD27^+$) соответствует показателям, выявляемым в группе контроля. У пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения уровень экспрессии MFI CD23 на В1-клетках ($CD5^+CD23^+$) и В-клетках памяти ($CD19^+CD27^+$) соответствует контрольному диапазону.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения статистически значимо, относительно контрольных показателей, повышается уровень экспрессии MFI CD23 на общей фракции В-лимфоцитов ($CD19^+$), но при снижении на В2-клетках ($CD5^-CD23^+$) и наивных В-клетках ($CD19^+CD27^-$). Таким образом, после проведения радионуклидного лечения абсолютное количество Treg продолжает снижаться в течение 6 месяцев, при сохранении пониженного уровня наивных и терминально-дифференцированных Treg. Кроме того, на 6 месяце наблюдения в крови у пациентов с болезнью Грейвса, также снижается количество Treg эффекторной памяти.

Субпопуляционный состав В-лимфоцитов в крови у пациентов с болезнью Грейвса не изменяется после радионуклидного лечения, но количество В-клеток памяти сохраняется на низком уровне в течение всего периода наблюдения. В то же время, у пациентов с болезнью Грейвса значительно снижается количество общих активированных В-лимфоцитов, а также понижается содержание всех активированных субпопуляций В-клеток, наблюдается снижение уровня экспрессии рецептора CD23 на мембране В2-клеток и наивных В-клеток.

Методом корреляционного анализа охарактеризованы взаимосвязи между отдельными субпопуляциями Treg, Th-, цитотоксических Т-клеток, а также В-лимфоцитов и концентрацией гормонов щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса, а также в контрольной группе. Установлено, что у лиц контрольной группы количество наивных Treg ($CD45R0^-CD62L^+$) отрицательно взаимосвязано с концентрацией свТ3 ($r = -0,86$, $p = 0,014$). При этом, содержание Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) положительно коррелирует с уровнем свТ4 ($r = 0,82$, $p = 0,023$). У женщин контрольной группы не выявлены взаимосвязи между фенотипическими показателями В-лимфоцитов и уровнями концентрации тиреоидных гормонов. В то же время, обнаружены взаимосвязи между количеством Treg и содержанием В-клеток: общие Treg – $CD19^+CD23^+$ -клетки ($r = 0,47$, $p = 0,005$), общие Treg – $CD19^+CD5^+CD23^+$ -клетки ($r = 0,66$, $p < 0,001$) и терминально-дифференцированные Treg ($CD45R0^-CD62L^-$) – $CD19^+CD27^+CD23^+$ -клетки ($r = -0,48$, $p = 0,038$).

У пациентов с болезнью Грейвса, до радионуклидного лечения, установлена положительная взаимосвязь процентного количества терминально-дифференцированных Treg ($CD45R0^-CD62L^-$) с концентрацией свТ3 ($r = 0,64$, $p = 0,025$). Также, у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения процентный уровень общих Treg только положительно коррелирует с количеством активированных $CD19^+CD23^+$ -клеток ($r = 0,51$, $p = 0,036$) и $CD19^+CD5^+CD23^+$ -клеток ($r = 0,69$, $p = 0,003$), а уровни концентрации аутоантител к рТТГ положительно взаимосвязаны с содержанием $CD19^+CD5^+CD23^+$ -клеток ($r = 0,64$, $p = 0,004$) и

CD19⁺CD5⁻CD23⁺-клеток ($r = 0,58$, $p = 0,025$). При этом содержание CD19⁺CD27⁺CD23⁺-клеток, также, положительно взаимосвязано с уровнями CD45R0⁻CD62L⁺Treg ($r=0,67$, $p=0,045$) и CD45R0⁻CD62L⁻Treg ($r=0,68$, $p=0,046$). Через 1 месяц после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса выявлены положительные взаимосвязи аутоантител к рТТГ с количеством CD19⁺CD27⁻-клеток ($r = 0,67$, $p = 0,009$) и CD19⁺CD5⁻CD23⁺-клеток ($r = 0,70$, $p = 0,025$). При этом, содержание общих Treg положительно взаимосвязано с уровнями CD19⁺CD23⁺-клеток ($r = 0,70$, $p = 0,002$) и CD19⁺CD5⁺CD23⁺-клеток ($r = 0,79$, $p = 0,001$). В данный период обследования у больных выявляются связи уровней CD19⁺CD27⁺CD23⁺-клеток с количеством Treg эффекторной памяти CD45R0⁺CD62L⁻ ($r = - 0,73$, $p = 0,016$) и терминально-дифференцированными CD45R0⁻CD62L⁻ Treg ($r = 0,83$, $p = 0,003$).

Через 3 месяца после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса обнаружены сильные, положительные взаимосвязи уровней концентрации аутоантител к рТТГ с уровнями экспрессии MFI CD23 на CD19⁺CD5⁺-клетках ($r = 0,88$, $p=0,006$) и CD19⁺CD27⁻-клетках ($r = 0,79$, $p = 0,035$). Также, установлено, что в данный период обследования у больных процентное число общей фракции Treg положительно коррелирует с содержанием CD19⁺CD23⁺-клеток ($r = 0,66$, $p = 0,038$) и CD19⁺CD5⁺CD23⁺-клеток ($r = 0,74$, $p = 0,015$). Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса уменьшается количество взаимосвязей между исследуемыми показателями. Обнаружены только две взаимосвязи количества CD19⁺CD27⁺CD23⁺-клеток с уровнями концентрации аутоантител к рТТГ ($r=-0,35$, $p=0,043$) и процентным содержанием общих Treg ($r = 0,72$, $p = 0,030$). Исходя из особенностей выявленных корреляций, можно заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса концентрация аутоантител к рТТГ взаимосвязана только с фенотипическими показателями В-лимфоцитов, как до, так и после радионуклидного лечения, причем, преимущественно, с активированными субпопуляциями В-клеток. Только на 3 месяце после РЙТ выявляется дисбаланс в интегрированных взаимодействиях между количеством Treg и В-лимфоцитами.

При этом, только на 6 месяце после радионуклидного лечения в системе связей В-клеток проявляются особенности, характеризующие нарушения в механизмах аутоиммунного процесса при болезни Грейвса.

Таким образом, при исследовании фенотипического состава Т- и В-лимфоцитов в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения обнаружены не только статистически значимые различия, как относительно показателей контрольной группы, так и значений, выявляемых у больных в динамике после РИТ, но и установлены патологические субпопуляции клеток иммунной системы, дефект которых сохраняется и через 6 месяцев после радионуклидного лечения.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса радионуклидное лечение оказывает иммуносупрессивное действие на абсолютное и процентное число общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), процентное содержание наивных ($CD45R0^-CD62L^+$), терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, активированных фракций В1-, В2-лимфоцитов, наивных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$), а также на уровень экспрессии активационного маркера MFI CD23 на В2-клетках ($CD19^+CD5^-$) и наивных В-клетках ($CD19^+CD27^-$). Снижение функциональной активности клеток адаптивного иммунитета и восстановление до контрольных значений относительного числа наивных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения может реализовываться в ингибировании аутоиммунного процесса. Следует подчеркнуть, что выявленное снижение абсолютного числа Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), процентного числа наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, а также В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$), активированных В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) и В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса определяется, как исходно, так и реализуется независимо от сроков наблюдения в динамике после радионуклидного лечения, что

позволяет отнести данные фракции клеток к патологическим, дефект которых тесно связан с аутоиммунным процессом и может рассматриваться, как один из векторов иммуотропной терапии заболевания.

На основании установленных клинико-иммунологических маркеров персистенции аутоиммунного процесса у пациентов с болезнью Грейвса разработан способ раннего прогнозирования эффективности радионуклидного лечения заболевания, включающий в себя расчет коэффициента Т-хелперной регуляции (ТХР), который основан на вычислении процентного количества активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) к процентному количеству В-лимфоцитов (ТХР = активированные Th-клетки/В-лимфоциты) (таблица 37, рисунок 16).

Таблица 37 – ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза эффективности радионуклидного лечения при болезни Грейвса

Коэффициент	AUC	Оптимальное значение	Чувствит., %	Специф., %	p
$CD3^+CD4^+CD25^+ / CD19^+$	1	0,104	100	100	0,0001

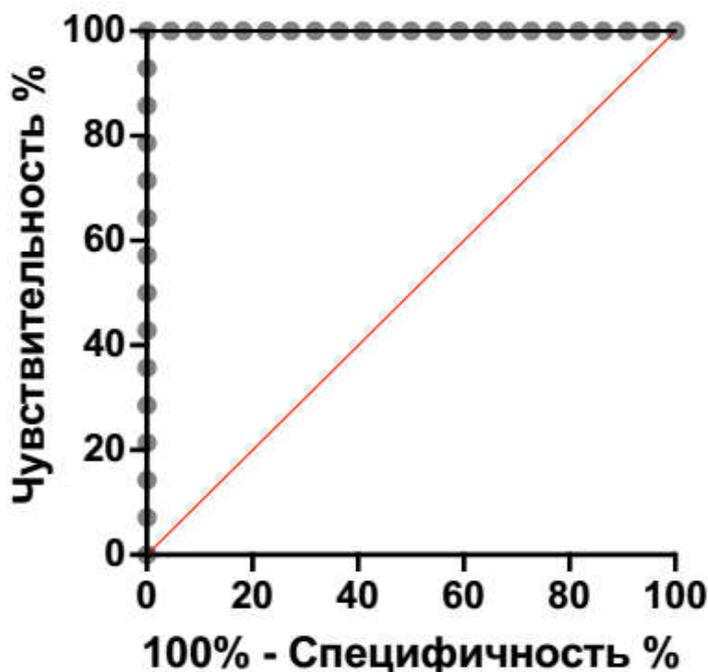


Рисунок 16 – ROC-кривая значения коэффициента ТХР и исхода радионуклидного лечения болезни Грейвса

При значении ТХР ниже 0,105 прогнозируют развитие стойкого пострадиационного гипотиреоза через 6 месяцев после радионуклидного лечения, значение ТХР равное и выше 0,105 свидетельствует о повышенном количестве активированных Th-клеток, которые опосредуют аутоиммунные процессы в организме и, снижают эффективность РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса, с прогнозированием отсутствия стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе радионуклидного лечения. Значение 0,105 получено опытным путем, на основании сопоставления значений рассчитываемого коэффициента ТХР и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения.

Способ прогноза реализуется следующим образом. У пациентов с болезнью Грейвса перед проведением радионуклидного лечения забирают венозную кровь (для анализа достаточно 100 мкл) свободным током в пробирки с ЭДТА. Образец 100 мкл крови с ЭДТА вносят в пробирку проточного цитофлуориметра и для окрашивания активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и В-лимфоцитов ($CD19^+$) вносят моноклональные антитела (в количестве указанных производителем). Например, CD45-ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), CD3-PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), CD4-PE (phycoerythrin), CD25-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и CD19-FITC (fluorescein isothiocyanate). Пробирка помещается в темное место на 15 минут, затем в пробирку вносят 1 мл лизирующего раствора (например, VersaLyse (Beckman-Coulter, США)) и снова помещают в темное место на 15 минут. Анализ окрашенных клеток осуществляют на любом проточном цитофлуориметре (например, Navios, BeckmanCoulter, USA). Для повышения степени точности анализа необходимо проанализировать не менее 50000 лимфоцитов. Затем рассчитывают коэффициент Т-хелперной регуляции (ТХР): $ТХР = \text{активированные Th-клетки} / \text{В-лимфоциты}$. При значении ТХР ниже 0,105 прогнозируют развитие стойкого пострадиационного гипотиреоза через 6 месяцев после РЙТ, при значении равном и выше 0,105 – отсутствие стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе радионуклидного лечения.

Данный способ апробирован на 25 пациентах с болезнью Грейвса. По результатам обследования пациентов с болезнью Грейвса по заявленному способу установлено, что у 21 (84,00 %) больных после радионуклидного лечения будет достигнут стойкий пострадиационный гипотиреоз. У этих пациентов величина коэффициента ТХР была ниже 0,105. У 4 (16,00 %) больных было спрогнозировано отсутствие стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе радионуклидного лечения, величина коэффициента ТХР у них была равной и выше 0,105. По результатам дальнейшего клинического наблюдения установлено совпадение прогноза в 100% случаев.

Таким образом, разработанный способ информативен, отвечает современным требованиям к методам клинико-лабораторной диагностики, позволяет своевременно осуществить прогноз эффективности радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса и может быть рекомендован для применения в клинической практике.

6.3. Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

В основе прогрессирования аутоиммунного воспаления при болезни Грейвса немаловажная роль принадлежит окислительному стрессу [142]. Гипертиреоз аутоиммунного генеза связан с повышенным потреблением кислорода фагоцитирующими клетками, дисфункцией дыхательной цепи митохондрий, повышенным внутриклеточным потреблением АТФ и увеличением продукции АФК [139]. Чрезмерная активация окислительного стресса, вызванная усиленным синтезом АФК, участвует в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний посредством нескольких механизмов: усиление воспаления, проапоптотический эффект и нарушение иммунологической толерантности [62].

Однако, в настоящее время отсутствуют исследования количественной характеристики образования различных пулов АФК у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от функции щитовидной железы, предшествующей консервативной

терапии тиамазолом и динамики изменений показателей оксидативного стресса клеток иммунной системы после радионуклидного лечения.

Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [90]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемиллюминесценции нейтрофилов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы и уровень продукции первичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса. В формировании пула вторичных форм кислорода в нейтрофилах принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [24]. Люминол способен вступать в хемиллюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными АФК, причем как во внеклеточном пространстве, так, и проникать внутрь клеток, и вступать в реакцию в фаголизосомах. В связи с этим, для оценки уровня продукции первичных и вторичных кислородных радикалов в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения был выбран метод хемиллюминесценции.

Протокол подготовки пациентов с болезнью Грейвса к РЙТ предполагает двухнедельную отмену антитиреоидной терапии для обеспечения активного захвата радиофармпрепарата щитовидной железой, который определяет эффективность радионуклидного лечения [194]. Терапия антитиреоидными препаратами оказывает краткосрочный иммуномодулирующий эффект, который реализуется в дебюте гипертиреоза Грейвса, связан с достижением медикаментозного эутиреоза, а постепенное снижение дозы тиреостатика до поддерживающей создает иммуногенный потенциал для стимулирования функциональной активности провоспалительных клеток и рецидива заболевания [158]. В связи с этим, настоящая задача исследования заключалась в изучении кинетических параметров синтеза отдельных АФК и интегрального состояния окислительных процессов нейтрофилов, а также показателей тиреоидного статуса, у пациентов с ранее достигнутым стойким медикаментозным эутиреозом в исходе двухнедельной отмены тиамазола, перед лечением ра-

диоактивным йодом, которое представлялось актуальным не только для выяснения иммунологических основ рецидива заболевания, но и в плане выявления патогенетических мишеней иммуотропного лечения заболевания.

При оценке тиреоидного статуса в исходе двухнедельной отмены тиамазола были выделены группы медикаментозного эутиреоза, изолированного Т3-тиреотоксикоза и манифестного гипертиреоза.

Клинико-гормональная характеристика групп пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от тиреоидной функции через две недели после отмены тиамазола, перед радионуклидным лечением, представлена в таблице 38.

При сходном протоколе подготовки к радионуклидному лечению и наличии подтвержденного лабораторно медикаментозного эутиреоза у всех пациентов с болезнью Грейвса спустя две недели после отмены тиамазола были установлены статистически значимые различия в показателях тиреоидного статуса. У большей части пациентов с болезнью Грейвса в исходе кратковременной отмены тиамазола развился клинико-лабораторный симптомокомплекс изолированного Т3-тиреотоксикоза и только у трети больных подтвержден стойкий медикаментозный эутиреоз.

Причем, именно у пациентов с изолированным Т3-тиреотоксикозом выявлен наиболее высокий уровень антител к рТТГ относительно значений, установленных в группе медикаментозного эутиреоза, но при отсутствии статистически значимых различий значений титра антител к рТТГ, установленных у пациентов с манифестным гипертиреозом. При этом, обращает на себя внимание, что у пациентов с болезнью Грейвса с изолированным Т3-тиреотоксикозом медиана длительности приема тиамазола статистически значимо выше, в сравнении с пациентами с медикаментозным эутиреозом.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса объем щитовидной железы статистически значимо увеличен в сравнении с показателями контрольной группы, но не различается в зависимости от функции щитовидной железы перед радионуклидным лечением.

Таблица 38 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса через две недели после отмены тиамазола перед радионуклидным лечением (Me, Q₁– Q₃)

	Контроль	Медикаментозный эутиреоз	Изолирован- ный ТЗ– тиреотоксикоз	Манифестный гипертиреоз
	n = 85	n = 16	n = 17	n = 15
	1	2	3	4
Длительность приема тиамазола, мес.	–	9,0 (8,0 – 13,0)	12,0 (10,0 – 14,0) p ₂ < 0,001	9,0 (7,0 – 11,0)
Доза тиамазола перед отменой, мг	–	10 (2,5 – 10)	10 (5 – 10)	10 (5–10)
ТТГ, мЕд/л	1,13 (0,86 – 1,51)	0,59 (0,48 – 2,37)	0,01 (0,005 – 0,02) p _{1,2} < 0,001	0,01 (0,005 – 0,32) p _{1,2} < 0,001
свТЗ, пмоль/л	4,07 (2,61 – 5,53)	4,52 (4,04 – 5,24) p ₁ = 0,012	6,34 (4,61–8,71) p ₁ < 0,001	6,53 (4,89 – 8,03) p ₁ < 0,001
свТ4, пмоль/л	14,10 (12,28 – 15,80)	13,87 (11,83 – 16,22) p ₁ = 0,016	15,61 (11,97 – 17,57) p ₁ < 0,01	23,06 (20,41 – 32,37) p _{1,2,3} < 0,001
Антитела к рТТГ, мЕд/л	0,24 (0,18 – 0,43)	10,88 (5,77 – 14,28) p ₁ < 0,001	21,06 (13,21 – 27,34) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,028	12,56 (3,45 – 30,34) p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,010

Продолжение таблицы 38

	Контроль	Медикаментозный эутиреоз	Изолирован- ный ТЗ– тиреотоксикоз	Манифестный гипертиреоз
	n = 85	n = 16	n = 17	n = 15
	1	2	3	4
Объем щито- видной желе- зы, мл	9,91 (9,41 – 12,63)	24,81 (17,15 – 29,89) $p_1 < 0,001$	20,92 (11,5 – 24,51) $p_1 < 0,001$	20,33 (18,30 – 24,03) $p_1 < 0,001$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с контрольными величинами, p_2 — статистически значимые различия с показателями пациентов с медикаментозным эутиреозом, p_3 — статистически значимые различия с показателями пациентов с изолированным ТЗ-тиреотоксикозом.

Люцигенин-зависимая хемилюминисценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола перед радионуклидным лечением, отражающая уровень продукции первичных АФК, представлена в таблице 39.

Полученные данные свидетельствуют об отличии большинства показателей спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминисценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса независимо от функции щитовидной железы в исходе двухнедельной отмены тиамазола при сравнении с контрольной группой.

Установлено, что независимо от тиреоидной функции у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо, относительно контрольных величин снижен показатель максимума синтеза первичных АФК (I_{max}) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминисценция нейтрофилов, свидетельствующий о низком потоке АФК, образуемых в системе НАДФН-оксидазы. Однако, показатель скорости образования первичных АФК (T_{max}) спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминисценция нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не изменялся, как относительно контрольных величин, так и между группами больных.

Таблица 39 – Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через две недели после отмены тиамазола перед радионуклидным лечением (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Медикаментозный эутиреоз n = 16	Изолирован- ный Т3– тиреотоксикоз n = 17	Манифестный гипертиреоз n = 15
	1	2	3	4
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	1741 (1398 – 2057)	1594 (1430 – 2170)	1770 (1169 – 2138)	1682 (1354 – 2678)
I _{max} , о.е.×10 ³	10,15 (0,87 – 28,59)	4,12 (1,92 – 8,45) p ₁ = 0,003	4,73 (1,21 – 6,35) p ₁ = 0,001	3,03 (0,43 – 9,01) p ₁ = 0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	1,74 (1,03 – 3,71)	12,71 (3,94 – 26,53) p ₁ = 0,001	14,02 (2,83 – 23,85) p ₁ = 0,014	7,77 (0,83 – 30,20) p ₁ = 0,084
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	1275 (809 – 1768)	1423 (1039 – 2034)	1185 (959 – 1584)	1355 (1023–2260)
I _{max} , о.е.×10 ³	12,78 (6,45 – 42,81)	6,31 (3,07 – 24,47) p ₁ = 0,008	7,78 (2,69 – 19,65) p ₁ = 0,004	4,55 (1,27 – 11,67) p ₁ < 0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31 (1,45 – 8,18)	13,27 (10,32 – 60,79) p ₁ = 0,001	24,18 (7,54 – 45,55) p ₁ < 0,001	16,67 (1,82 – 26,82) p ₁ = 0,028
S _{инд./} S _{спонт.}	1,89 (0,99 – 3,22)	0,99 (0,81 – 2,97)	1,71 (1,15 – 4,08)	1,86 (1,12 – 2,96)

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с контрольными величинами.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола базальная суммарная продукция первичных АФК (S) значительно возрастает относительно контрольных величин в группе больных с медикаментозным эутиреозом и изолированным ТЗ-тиреотоксикозом, но в меньшей степени у пациентов с манифестным гипертиреозом.

При индукции хемилюминесцентной реакции нейтрофилов крови зимозаном у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола наблюдалась похожая кинетика хемилюминесцентного ответа нейтрофилов. Независимо от функционального состояния щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса установлено статистически значимое, относительно контрольных величин, снижение показателя максимума синтеза первичных АФК (I_{\max}), но при повышении показателя суммарной продукции (S) и отсутствии изменений скорости образования первичных АФК (T_{\max}) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценция нейтрофилов.

Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола перед радионуклидным лечением, отражающая уровень продукции вторичных АФК, представлена в таблице 40. При исследовании спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса установлена похожая закономерность образования вторичных АФК, как и при регистрации показателей генерации первичных АФК в реакциях с люцегиноном. Независимо от функционального состояния щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса установлено статистически значимое, относительно контрольных величин, снижение показателя максимума синтеза (I_{\max}), но при отсутствии изменений скорости образования вторичных АФК (T_{\max}), как спонтанной, так и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценция нейтрофилов. Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола, значительно возростал показатель суммарной продукции вторичных АФК (S), как в состоянии относительно покоя нейтрофилов, так и при антигенном воздействии на клетки иммунной системы.

Таблица 40 – Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через две недели после отмены тиамазола перед радионуклидным лечением (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Медикаментозный эутиреоз n = 16	Изолирован- ный Т3– тиреотоксикоз n = 17	Манифестный гипертиреоз n = 15
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	987 (627 – 2174)	922 (240 – 1193)	1222 (639 – 2438)	1196 (308 – 1511)
I _{max} , о.е.×10 ³	39,85 (7,73 – 66,61)	16,83 (6,75 – 32,91) p ₁ = 0,005	18,79 (8,63 – 33,96) p ₁ = 0,010	22,27 (7,77 – 51,85) p ₁ = 0,017
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	5,37 (3,08 – 13,45)	50,95 (14,52 – 100,27) p ₁ = 0,001	44,13 (23,74 – 63,15) p ₁ = 0,010	55,27 (19,24 – 109,41) p ₁ = 0,001
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
T _{max} , сек.	912 (631 – 1188)	806 (558 – 1417)	838 (736 – 1330)	930 (277 – 1130)
I _{max} , о.е.×10 ³	147,24 (17,75 – 247,37)	31,47 (19,78 – 77,98) p ₁ = 0,001	48,16 (26,83– 109,08) p ₁ = 0,004	51,64 (7,19 – 106,35) p ₁ < 0,001
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	16,05 (6,59 – 35,74)	108,42 (61,88 – 222,06) p ₁ < 0,001	113,42 (74,16 – 318,42) p ₁ < 0,001	90,31 (13,68 – 334,72) p ₁ = 0,032
Синд./ Спонт.	2,26 (1,34 – 3,95)	3,91 (2,17 – 7,81)	2,48 (2,15 – 3,43)	2,25 (1,84 – 3,51)

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с контрольными величинами.

Причем, показатели генерации вторичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола статистически значимо не различились в зависимости от тиреоидной функции.

Индекс активации (Синд./Спонт.) статистически значимо не изменялся относительно контрольных величин и в зависимости от тиреоидной функции, между группами пациентов с болезнью Грейвса, как в ходе люцигенин-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции, так и в реакциях с люминолом.

При корреляционном анализе показателей продукции первичных и вторичных АФК в контрольной группе уровень свТ4 отрицательно коррелировал с I_{\max} во всех реакциях хемилюминесценции: люцигенин-зависимой спонтанной ($r = -0,77$; $p = 0,01$) и индуцированной ($r = -0,46$; $p = 0,031$), люминол-зависимой спонтанной ($r = -0,44$; $p = 0,033$) и зимозан-индуцированной ($r = -0,59$; $p = 0,003$); а также с T_{\max} люцигенин-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции ($r = -0,46$; $p = 0,031$). Уровень свТ3 в группе контроля положительно коррелировал с I_{\max} ($r = 0,82$; $p = 0,001$) и S ($r = 0,68$; $p = 0,014$) люцигенин-зависимой спонтанной хемилюминесценции.

У пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола перед радионуклидным лечением, независимо от тиреоидной функции, установлены положительные связи уровня антитела к рТТГ и S ($r = 0,32$; $p = 0,034$), а также содержания свТ3 и I_{\max} ($r = 0,34$; $p = 0,032$) люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов.

Выявленные взаимосвязи подтверждают, что антитела к рТТГ независимо от тиреоидной функции играют основную роль в стимуляции щитовидной железы, а избыточная генерация свободных радикалов, вероятно, усиливает презентацию тиреоидных антигенов и поддерживает аутоиммунный процесс. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса интенсивность образования вторичных АФК при воздействии антигенного стимула пропорциональна уровню свТ3, независимо от функционального состояния щитовидной железы.

Выявленная взаимосвязь подтверждает высокую биологическую активность и регуляцию скорости потребления тканями кислорода свТЗ [72].

Результаты проведенных исследований позволили установить изменения хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса на фоне двухнедельной отмены тиамазола перед радионуклидным лечением. Обнаруженные особенности хемилюминесцентного ответа нейтрофилов позволяют предположить, что пониженный уровень фонового образования АФК, наблюдаемый у пациентов с болезнью Грейвса независимо от функционального состояния щитовидной железы, приводит к ускоренной реализации клетками своих продуцирующих способностей и более интенсивному синтезу АФК.

Развитие гипертиреоза в исходе двухнедельной отмены тиамазола у большинства пациентов с болезнью Грейвса отражает краткосрочные эффекты терапии анти тиреоидными препаратами в отношении стойкости достигнутого медикаментозного эутиреоза и подтверждает, что функция щитовидной железы является мишенью для атаки АФК, с дальнейшим срывом иммунологической толерантности и рецидивом заболевания.

Следующей задачей исследования являлось изучить у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения кинетику различных реакций хемилюминесценции и активность внутриклеточных ферментов нейтрофилов периферической крови, которые отражают, соответственно, уровень продукции супероксидного аниона и вторичных кислородных радикалов, и состояние важнейших метаболических реакций клеток иммунной системы.

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлена в таблице 41.

При оценке спонтанной реакции люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения установлено статистически значимое снижение показателя интенсивности образования первичных АФК (I_{max}) относительно контрольных значений.

Таблица 41 – Люцигенин-зависимая хемилюминисценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Спонтанная хемилюминисценция					
T _{max} , сек.	1741 (1398 – 2057)	1603 (1429 – 2166)	1521 (1083 – 2381)	1763 (413 – 2979)	1951 (1427 – 2995)
I _{max} , о.е.×10 ³	10,15 (0,87 – 28,59)	3,41 (0,19 – 8,42) p ₁ = 0,010	4,23 (3,05 – 10,21) p ₁ = 0,021	4,23 (2,27 – 8,51) p ₁ = 0,002	1,52 (1,11 – 4,21) p _{1,2,3} < 0,001 p ₄ = 0,006
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	1,74 (1,03 – 3,71)	14,24 (3,84 – 31,61) p ₁ = 0,011	16,79 (11,37 – 59,41) p ₁ = 0,023	10,06 (2,23 – 19,63) p ₁ = 0,007 p ₃ < 0,001	9,89 (1,25 – 15,32) p ₁ = 0,033 p ₃ < 0,001
Зимозан–индуцированная хемилюминисценция					
T _{max} , сек.	1275 (809 – 1768)	1143 (1009 – 1365)	1121 (1024 – 1562)	1432 (925 – 2191)	1295 (911 – 1867)
I _{max} , о.е.×10 ³	12,78 (6,45 – 42,81)	8,42 (3,75 – 15,63) p ₁ = 0,012	9,25 (2,45 – 21,46) p ₁ = 0,006	7,75 (1,23 – 11,45) p ₁ = 0,034	2,43 (1,12 – 12,51) p _{1,2,4} < 0,001 p ₃ = 0,010
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	3,31 (1,45 – 8,18)	23,49 (9,87 – 39,23) p ₁ = 0,006	29,32 (7,51 – 123,72) p ₁ = 0,003	25,61 (6,11 – 47,32) p ₁ = 0,002	4,96 (2,61 – 34,54) p _{2,3,4} < 0,001

Продолжение таблицы 41

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Синд./ Спонт.	1,89 (0,99 – 3,22)	1,65 (0,89 – 3,21)	1,45 (0,56 – 2,76)	1,32 (0,33 – 2,65) $p_{1,2} < 0,001$	2,34 (1,25 – 4,11) $p_4 = 0,045$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с контрольными величинами, p_2 — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p_3 — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p_4 — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

Причем, если до РЙТ, вероятно, это связано с иммуномодулирующим влиянием тиамазола, то при наблюдении в пострadiационном периоде изменение I_{max} у пациентов с болезнью Грейвса связано с воздействием ^{131}I , так как наиболее выраженное снижение данного показателя установлено через 6 месяцев после радионуклидного лечения. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после РЙТ уровень I_{max} статистически значимо понижен, как относительно контроля, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения. Также, у пациентов с болезнью Грейвса при спонтанной реакции люцегинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов выявлено статистически значимое увеличение показателя суммарной продукции первичных АФК (S) в сравнении с контрольными величинами, как исходно, так и в динамике после радионуклидного лечения. Однако, показатель суммарной продукции первичных АФК (S) у пациентов с болезнью Грейвса через 3 и 6 месяцев после РЙТ статистически значимо понижен в сравнении с величинами, установленными через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса скорость образования первичных АФК (T_{max}) статистически значимо не изменяется в динамике после радионуклидного лечения, как относительно контроля, так и в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде. При антигенном воздействии на ней-

трофилы периферической крови, в ходе реакций с люцегинином, у пациентов с болезнью Грейвса отмечается похожая кинетика хемилюминесцентной реакции: снижается интенсивность образования (I_{max}), увеличивается суммарная продукция (S), при отсутствии статистически значимого изменения скорости (T_{max}) образования первичных АФК, как до РЙТ, так и через 1 и 3 месяца после радионуклидного лечения относительно контрольных показателей.

Однако, к 6 месяцу наблюдения после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса показатель S зимозан–индуцированной люцегинин-зависимой хемилюминесценции, отражающий суммарный синтез первичных АФК при стимуляции нейтрофилов, статистически значимо снижается относительно значений, выявляемых до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения, но не различается с показателями контроля. При этом, через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса показатель интенсивности образования первичных АФК (I_{max}) зимозан–индуцированной люцегинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижен, как относительно контрольных величин, так и значений, выявляемых при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения.

Индекс активации ($S_{инд.}/S_{спонт.}$) люцегинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, как исходно, так и через 1 месяц после РЙТ соответствует контрольному диапазону, но статистически значимо снижен через 3 месяца после РЙТ, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании больных до радионуклидного лечения. Через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса индекс активации ($S_{инд.}/S_{спонт.}$) люцегинин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо повышается, в сравнении с показателями больных при обследовании через 3 месяца после радионуклидного лечения и соответствует контрольному диапазону.

Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения представлена в таблице 42.

Таблица 42 – Люминол-зависимая хемилюминисценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Спонтанная хемилюминисценция					
T _{max} , сек.	987 (627 – 2174)	1111 (319 – 1744)	1565 (266 – 2330)	301 (222 – 1130) p _{1,2,3} < 0,001	896 (267 – 1554)
I _{max} , о.е.×10 ³	39,85 (7,73 – 66,61)	18,79 (8,59 – 33,95) p ₁ = 0,003	42,01 (22,46 – 66,99) p ₂ = 0,023	12,48 (4,16 – 27,23) p ₁ = 0,023 p ₃ = 0,018	17,84 (6,29 – 27,93) p ₁ < 0,001 p ₃ = 0,037
S, о.е.×сек. × 10 ⁶	5,37 (3,08 – 13,45)	46,98 (20,48 – 80,51) p ₁ < 0,001	147,35 (54,38 – 347,41) p ₁ = 0,007 p ₂ = 0,011	28,46 (3,71 – 57,99) p ₃ = 0,007 p ₁ = 0,005	49,06 (13,18 – 78,74) p ₁ = 0,023 p ₃ = 0,010
Зимозан–индуцированная хемилюминисценция					
T _{max} , сек.	912 (631 – 1188)	832 (611 – 1147)	1037 (853 – 1272)	1412 (977 – 2021)	697 (491 – 1306) p ₄ = 0,043

Продолжение таблицы 42

Показатель	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ (n = 48)			
		До РЙТ	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
	1	2	3	4	5
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция					
I_{max} , о.е. $\times 10^3$	147,24 (17,75 – 247,37)	52,28 (26,82 – 108,51)	119,69 (71,91 – 144,53)	58,01 (33,85 – 102,35) $p_1 = 0,003$	48,06 (5,24 – 79,71) $p_1 = 0,011$
		$p_1 < 0,001$	$p_2 < 0,001$	$p_3 = 0,047$	$p_3 = 0,039$
S , о.е. \times сек. $\times 10^6$	16,05 (6,59 – 35,74)	123,25 (74,16 – 260,21)	417,85 (177,31 – 811,11)	144,24 (123,51 – 212,21) $p_1 = 0,001$	63,74 (12,16 – 206,01) $p_{1,2} < 0,001$
		$p_1 < 0,001$	$p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,023$	$p_3 = 0,024$	$p_3 = 0,002$ $p_4 = 0,032$
Синд./ Спонт.	2,26 (1,34 – 3,95)	2,75 (2,15 – 4,76)	2,34 (1,81 – 3,49)	4,93 (2,52 – 7,62) $p_{1,2} < 0,001$	2,88 (1,33 – 3,43) $p_3 = 0,045$
				$p_3 = 0,045$	$p_4 = 0,046$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с контрольными величинами, p_2 — -//- с показателями пациентов до РЙТ, p_3 — -//- с показателями пациентов через 1 мес. после РЙТ, p_4 — -//- с показателями пациентов через 3 мес. после РЙТ.

При проведении люминол-зависимой хемилюминисцентной реакции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, отражающей генерацию вторичных АФК, выявлены значительные изменения кислородного метаболизма нейтрофилов, как

относительно контрольных величин, так и в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до РЙТ статистически значимо снижена интенсивность образования (I_{\max}) и увеличена суммарная продукция (S) вторичных АФК, но при отсутствии различий показателя скорости развития хемилюминесцентной реакции относительно контроля. Это может быть связано, с одной стороны, с развитием субклинического гипертиреоза и отменой тиамазола, перед РЙТ, но, с другой стороны отражать долгосрочные иммуномодулирующие эффекты антитиреоидной терапии, сдерживающие интенсивность генерации в системе вторичных АФК.

Выявлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после радионуклидного лечения показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) спонтанной люминол-зависимой хемилюминесцентной реакции нейтрофилов повышается в 27,4 раз относительно контрольных величин и в 3,1 раза относительно значений, установленных до радионуклидного лечения. Показатель интенсивности образования вторичных АФК (I_{\max}) нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после РЙТ статистически значимо повышен в сравнении с показателями, выявляемыми при обследовании больных до радионуклидного лечения, но при соответствии контрольному диапазону.

Через 3 месяца после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса показатель S спонтанной люминол-зависимой хемилюминесцентной реакции нейтрофилов статистически значимо снижается относительно значений, установленных через 1 месяц после радионуклидного лечения, но остается повышенным относительно контроля. Показатель интенсивности образования вторичных АФК (I_{\max}) нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после РЙТ статистически значимо снижен в сравнении с контрольными показателями и значениями, выявляемыми при обследовании больных через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в реакциях с люминолом через 3 месяца после РЙТ транзиторно снижается показатель скорости образования вторичных АФК (T_{\max}), как относительно контрольных величин, так и показателей

T_{max} , выявляемых при обследовании больных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения, с последующим его восстановлением до контрольных значений к 6 месяцу наблюдения.

Через 6 месяцев после РИТ у обследуемых больных показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) спонтанной люминол-зависимой хемилюминисцентной реакции нейтрофилов повышен в 9,1 раз относительно контроля, но статистически значимо снижен в сравнении с величинами, выявляемыми при обследовании больных через 1 месяц после радионуклидного лечения. У пациентов с болезнью Грейвса через 3 и 6 месяцев после РИТ при спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов установлены закономерные изменения показателя максимального уровня синтеза вторичных АФК: снижение I_{max} , как в сравнении с контрольными величинами, так и показателями, выявляемыми при обследовании больных через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Через 6 месяцев после РИТ в ходе спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса сохраняется высоким показатель суммарного синтеза (S), но при сниженном показателе интенсивности образования вторичных АФК (I_{max}), как относительно контроля, так и значений, установленных при обследовании через 1 месяц после радионуклидного лечения. При этом, показатель T_{max} спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, отражающий скорость развития реакции в генерации пула вторичных АФК, у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после РИТ соответствует контрольным величинам.

После индукции хемилюминесцентного ответа нейтрофилов крови пациентов с болезнью Грейвса опсонизированным зимозаном в исследуемых пробах с люминолом до РИТ статистически значимо относительно контрольных величин снижен показатель интенсивности (I_{max}), но при повышении показателя суммарного синтеза (S) вторичных АФК нейтрофилов.

Через 1 месяц после радионуклидного лечения показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюми-

несценции нейтрофилов повышается в 26,1 раз относительно контрольных величин и в 3,4 раза относительно значений, установленных до радионуклидного лечения.

У пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после РЙТ установлено транзиторное повышение показателя максимального уровня синтеза вторичных АФК (I_{\max}) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов в сравнении с исходными величинами, при отсутствии статистически значимых различий с показателями контрольной группы. Через 3 месяца после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса показатель S зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается относительно значений, установленных через 1 месяц после радионуклидного лечения, но остается повышенным относительно контроля. Однако, через 3 месяца после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса показатель интенсивности образования вторичных АФК (I_{\max}) нейтрофилов статистически значимо снижается, как в сравнении с показателями контрольной группы, так и значениями, выявляемыми через 1 месяц после радионуклидного лечения.

Через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса показатель суммарного синтеза вторичных АФК (S) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов статистически значимо снижается относительно значений, установленных при обследовании больных до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения, но остается повышенным в сравнении с контрольными величинами. Следует отметить, что скорость синтеза вторичных АФК (T_{\max}) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не изменяется в сравнении с контрольными величинами на протяжении всего периода наблюдения. Однако, через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса выявлено статистически значимое замедление скорости синтеза вторичных АФК (T_{\max}) зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов в сравнении с показателями, установленными при обследовании больных через 3 месяца после радионуклидного лечения.

При этом, у пациентов с болезнью Грейвса, в пробах с люминолом выявлено статистически значимое транзиторное повышение индекса активации (Синд./Спонт.), как относительно контрольных величин, так и значений, установленных при обследовании больных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения. Однако, через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса индекс активации (Синд./Спонт.) статистически значимо снижен в сравнении с показателями, выявляемыми через 3 месяца после радионуклидного лечения и соответствует контрольному диапазону. В целом, кинетика зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции показала, что в условиях воздействия антигенного стимула, при стимуляции нейтрофилов крови пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения происходит снижение интенсивности наработки вторичных АФК, при этом суммарный их синтез остается повышенным за весь период наблюдения.

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса, как при обследовании до РЙТ, так и через 6 месяцев после радионуклидного лечения установлено повышение суммарной продукции первичных и вторичных АФК, уровень которых связан главным образом с цитопатогенным действием нейтрофилов при развитии аутоиммунного процесса. Следовательно, развитие эутиреоидного состояния вследствие радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса не приводит к восстановлению работы НАДФН-оксидазного комплекса и ингибированию реакций, результатом которых является продукция ряда вторичных АФК. Оценивая относительный уровень активации первого этапа в каскаде реакций образования первичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения следует отметить, что после антигенного воздействия отмечается восстановление компенсаторных возможностей и состоятельности клеточных мембран нейтрофилов. Можно заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения нарушены регуляторные механизмы, ответственные за реализацию кислородного метаболизма нейтрофилов преимущественно в системе вторичных АФК, что может привести к усилению аутоиммунного процесса и рецидиву заболевания.

6.4. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

Радионуклидное лечение при болезни Грейвса вызывает цитолиз тиреоцитов и сопровождается лизирующим эффектом комплементфиксирующих тиреоидных антител к рТТГ, и высвобождением их в периферический кровоток [193]. В связи с этим, в течение нескольких месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса имеется риск развития, как транзиторного гипертиреоза, так и рецидива заболевания [1, 5, 7]. Однако, функционально-метаболические основы иммунопатогенеза развития рецидива болезни Грейвса после радионуклидного лечения изучены недостаточно [367]. Внутриклеточный метаболизм нейтрофилов является одним из ключевых процессов, определяющих формирование антигенспецифической составляющей иммунной системы и реализацию ее эффекторной функции [33]. Причем, в основе функциональной активности нейтрофилов лежит стимуляция мембранных рецепторов клеток, которая реализуется с помощью цепи внутриклеточных сигналов, приводящих к изменению метаболических процессов и активности генов [238]. Однако, ключевую роль в регуляции интенсивности субстратных потоков по метаболическим путям и циклам определяют именно ферменты [31]. В свою очередь колебание тиреоидной функции и внутриклеточной концентрации субстратов после приема терапевтической активности ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса может влиять на активность ключевых ферментов нейтрофилов, в результате чего может изменяться доступность субстратов и функциональное реагирование нейтрофилов при развитии цитотоксической реакции, и рецидиве заболевания.

Наиболее информативными при исследовании внутриклеточного метаболизма являются дегидрогеназы, так как они катализируют ключевые биохимические процессы всех клеток [25]. В связи с этим, настоящей задачей исследования являлось изучение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения.

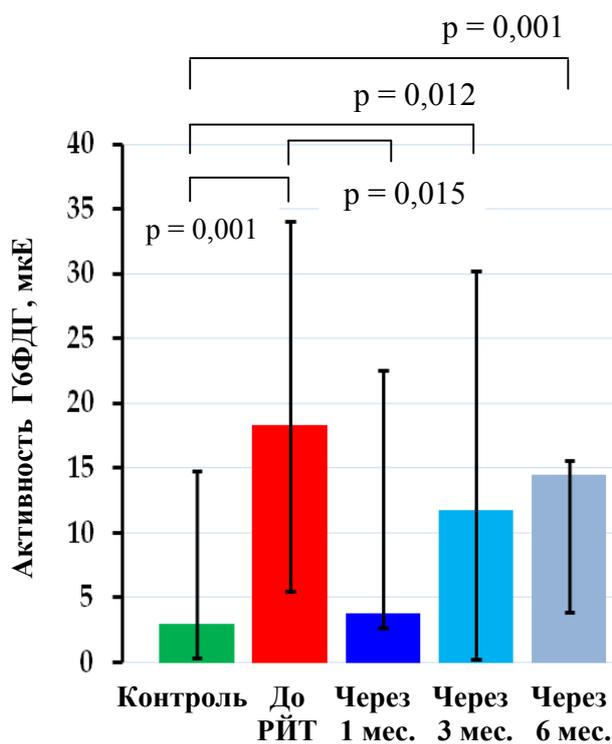
Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в нейтрофилах периферической крови до радионуклидного лечения статистически значимо повышена активность Г6ФДГ относительно контрольных величин (рисунок 17 а). Через 1 месяц после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса активность Г6ФДГ нейтрофилов снижается в сравнении с показателями, выявляемыми до радионуклидного лечения и соответствует контрольным значениям. Однако, через 3 месяца после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса уровень активности Г6ФДГ нейтрофилов вновь возрастает относительно контрольных величин, но статистически значимо не изменяется в сравнении с показателями, установленными до и через 1 месяц после радионуклидного лечения. Через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса уровень активности Г6ФДГ нейтрофилов повышен в 4,8 раз относительно контрольных величин, но статистически значимо не изменяется в сравнении с показателями активности ферменты, выявляемыми до и через 1, и 3 месяца после радионуклидного лечения. Повышение активности Г6ФДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса, вероятно, является компенсаторной реакцией, направленной на усиление синтеза НАДФН и рибозо-5-фосфата и увеличение интенсивности процессов макромолекулярного синтеза [31].

Выявлено, что у пациентов с болезнью Грейвса активность НАДФ-МДГ нейтрофилов статистически значимо возрастает через 6 месяцев после радионуклидного лечения, как относительно контрольных величин, так и значений, установленных через 1 и 3 месяца после РЙТ (рисунок 17 б).

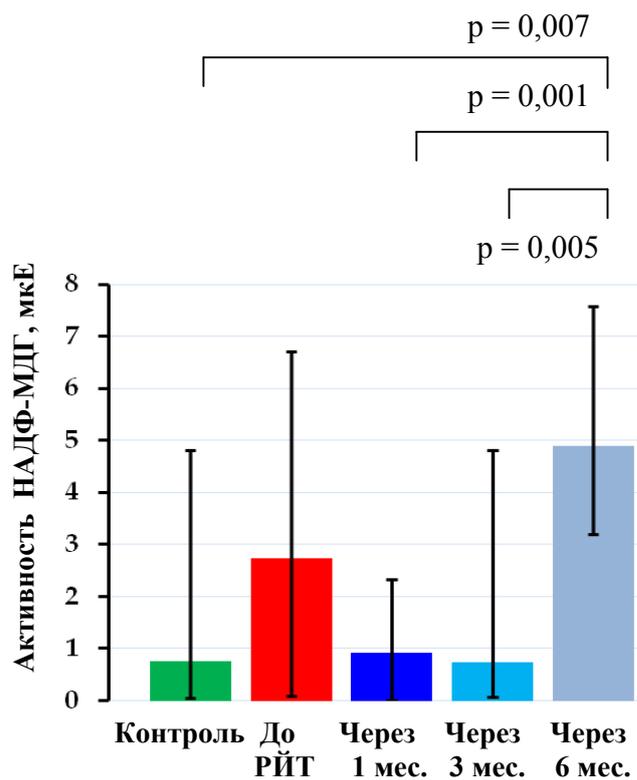
Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения в 9,4 раза, относительно контрольных величин, возрастает и остается практически на таком же уровне в динамике после РЙТ активность НАДФ-ИЦДГ нейтрофилов, что свидетельствует о высокой интенсивности реакций аминокислотного обмена (рисунок 17в).

Обнаружено, что у пациентов с болезнью Грейвса уровень активности НАДФ-ГДГ нейтрофилов до радионуклидного лечения возрастает относительно значений, выявляемых в контрольной группе, но статистически значимо не изменяется в динамике после радионуклидного лечения (рисунок 17 г).

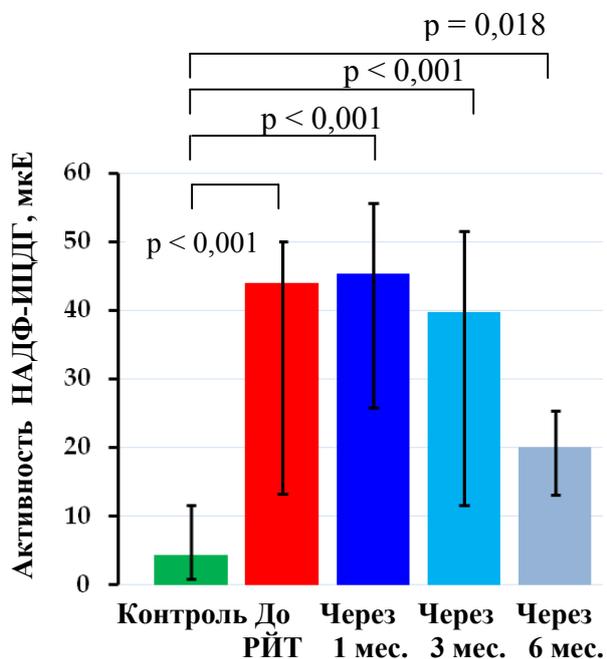
а)



б)



в)



г)

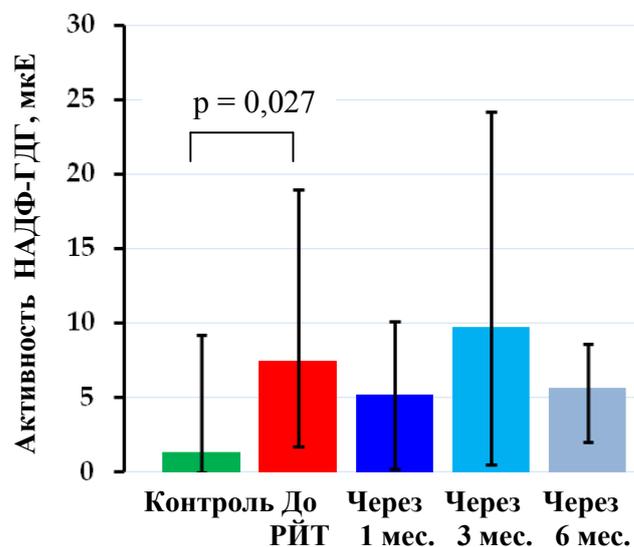


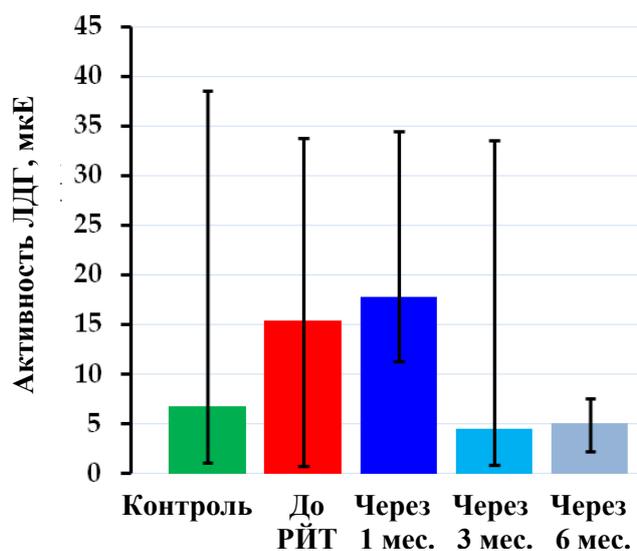
Рисунок 17 – Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

Исследование уровней активности НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после приема терапевтической активности ^{131}I позволило установить, что уровень активности ЛДГ нейтрофилов статистически значимо не изменяется в динамике после радионуклидного лечения (рисунок 18 а). Однако, у пациентов с болезнью Грейвса обнаружено повышение активности МДГ нейтрофилов, как до, так и через 1 и 3 месяца после радионуклидного лечения, в сравнении с показателями, выявляемыми в контрольной группе (рисунок 18 б). Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса уровень активности МДГ нейтрофилов статистически значимо снижается относительно значений, установленных до и через 1, и 3 месяца после РЙТ, и соответствует контрольным показателям. Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 3 месяца после радионуклидного лечения происходит транзиторное повышение активности ГДГ относительно контрольных значений, при отсутствии статистически значимых изменений активности фермента, как до, так и через 1 и 6 месяцев после РЙТ (рисунок 18 в).

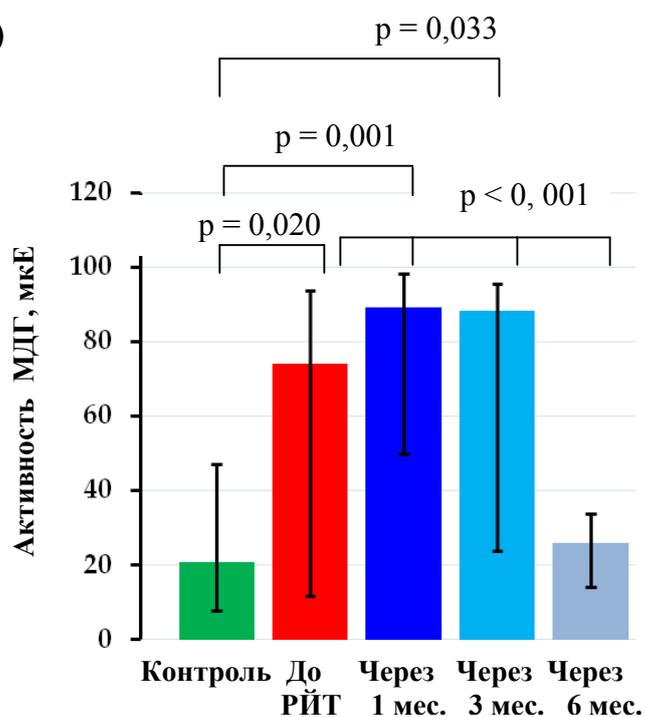
Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса исходно и через 1 месяц после радионуклидного лечения обнаружено, также, транзиторное увеличение, относительно контрольных величин, соответственно, в 11,2 и 36,8 раз активности ИЦДГ нейтрофилов (рисунок 18 г). Через 3 месяца после радионуклидного лечения уровень активности ИЦДГ в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса восстанавливается до контрольных величин. Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса активность ИЦДГ нейтрофилов статистически значимо снижается относительно значений, установленных до и через 1 месяц после радионуклидного лечения, и соответствует показателям, выявляемым в группе контроля.

Выявленное транзиторное повышение активности НАД-зависимых ГДГ и ИЦДГ у обследуемых больных через 3 месяца после РЙТ отражает долгосрочные влияния радионуклидного лечения на метаболизм клеток иммунной системы, и свидетельствует о компенсаторной активации переноса субстратов с реакцией аминокислотного обмена на ЦТК, и усилении субстратного потока по ЦТК [31].

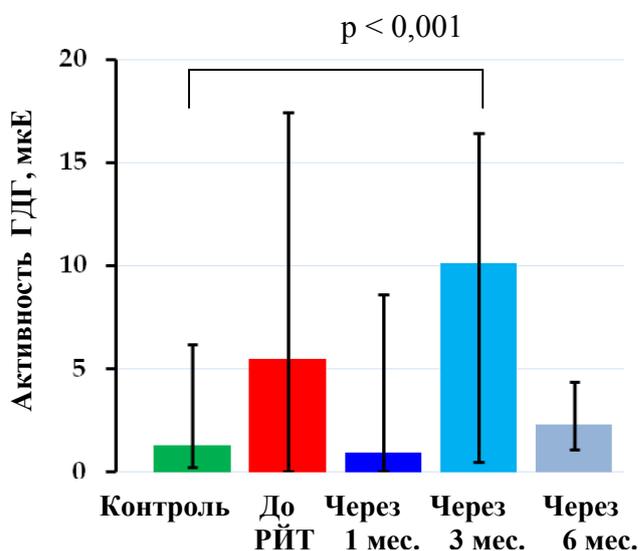
а)



б)



в)



г)

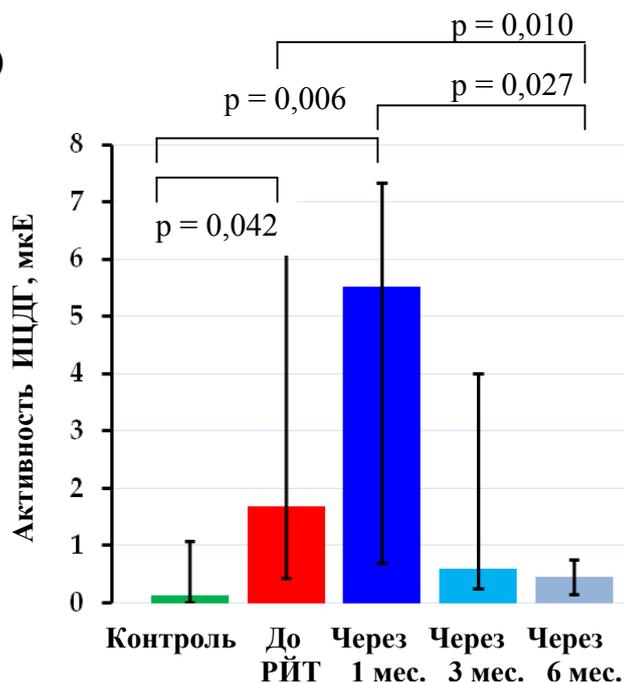


Рисунок 18 – Активность НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

При исследовании уровня активности НАДН- и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после РЙТ установлено статистически значимое повышение в 2,1 и 3,1 раза активности НАДН-ГДГ нейтрофилов, соответственно, через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения, в сравнении с показателями, выявляемыми в группе контроля (рисунок 19 а). При этом, активность НАДН-ГДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса до и через 1 месяц после радионуклидного лечения соответствовала контрольным величинам. Через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса установлено статистически значимое повышение активности НАДН-ГДГ нейтрофилов, как в сравнении с показателями контрольной группы, так и в сравнении с активностью фермента, выявленной, как исходно, так и через 1 и 3 месяца после приема терапевтической активности ^{131}I . При исследовании активности НАДФН-зависимых дегидрогеназнейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса на протяжении всего пострадиационного периода наблюдения выявляется низкий уровень НАДФН-ГДГ в сравнении с контрольными показателями, но при отсутствии статистически значимых изменений активности фермента в зависимости от сроков обследования в пострадиационном периоде (рисунок 19 б). У пациентов с болезнью Грейвса до приема терапевтической активности ^{131}I установлено более чем десятикратное снижение активности НАДФН-ГДГ нейтрофилов относительно контрольных значений.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения относительно контрольных величин в 1,7 раз снижена активность НАДН-МДГ (рисунок 19 в). Однако, у пациентов с болезнью Грейвса через 1 месяц после РЙТ активность НАДН-МДГ повышается в 1,8 раз в сравнении с исходными показателями и определяется практически на одном уровне через 3 и 6 месяцев после радионуклидного лечения, но соответствует контрольным значениям на протяжении всего пострадиационного периода наблюдения. Уровень активности НАДН-ЛДГ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения снижен относительно контрольных величин, но восстанавливается через 1 месяц после РЙТ и соответствует контрольному диапазону через 1, 3, и 6 месяцев после радионуклидного лечения (рисунок 19 г).

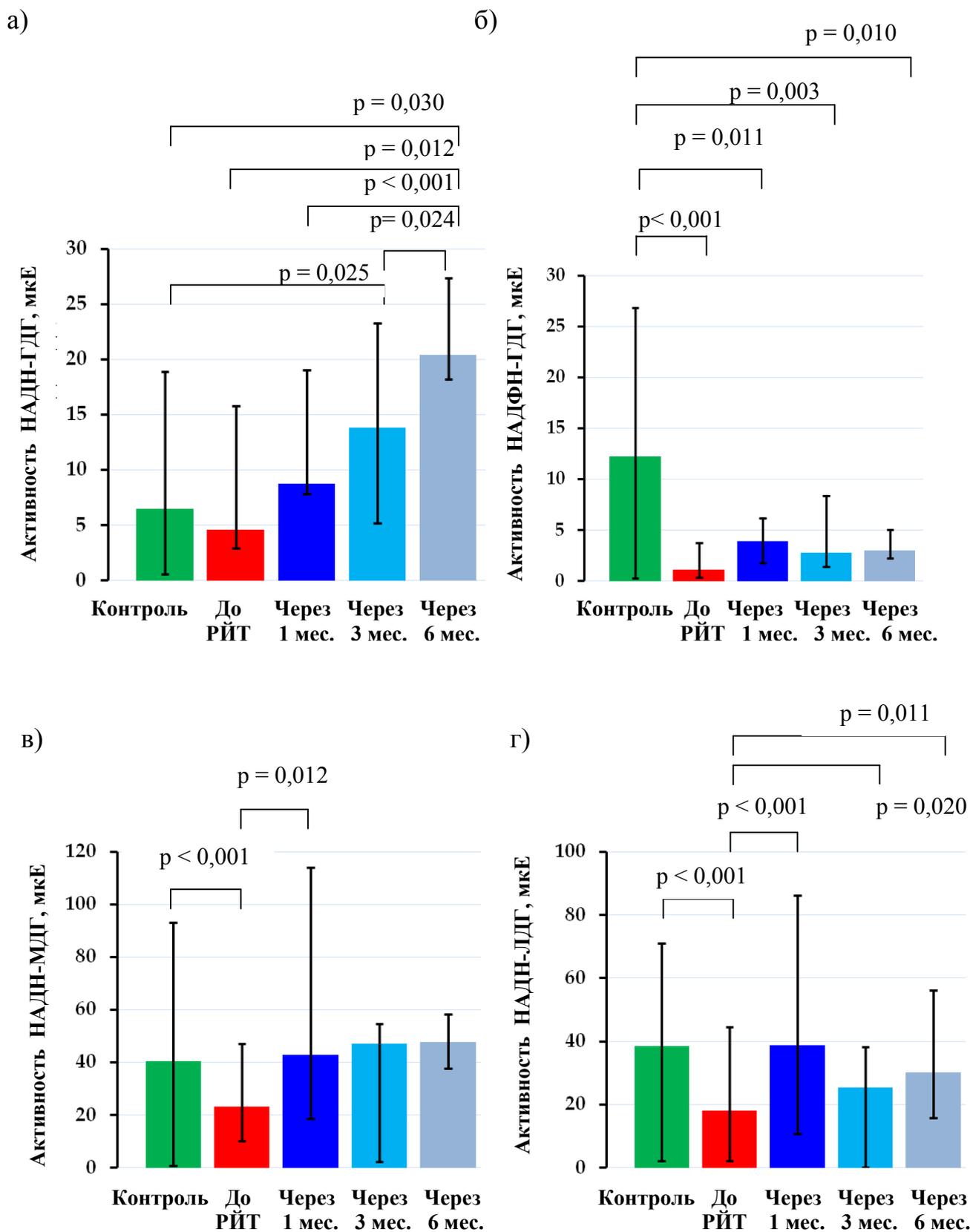


Рисунок 19 – Активность НАДН- и НАДФН-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

Уровень активности ГЗФДГ и ГР нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не изменялся, как относительно значений, выявляемых в контрольной группе, так и в зависимости от сроков наблюдения в пострадиационном периоде (рисунок 20 а, б).

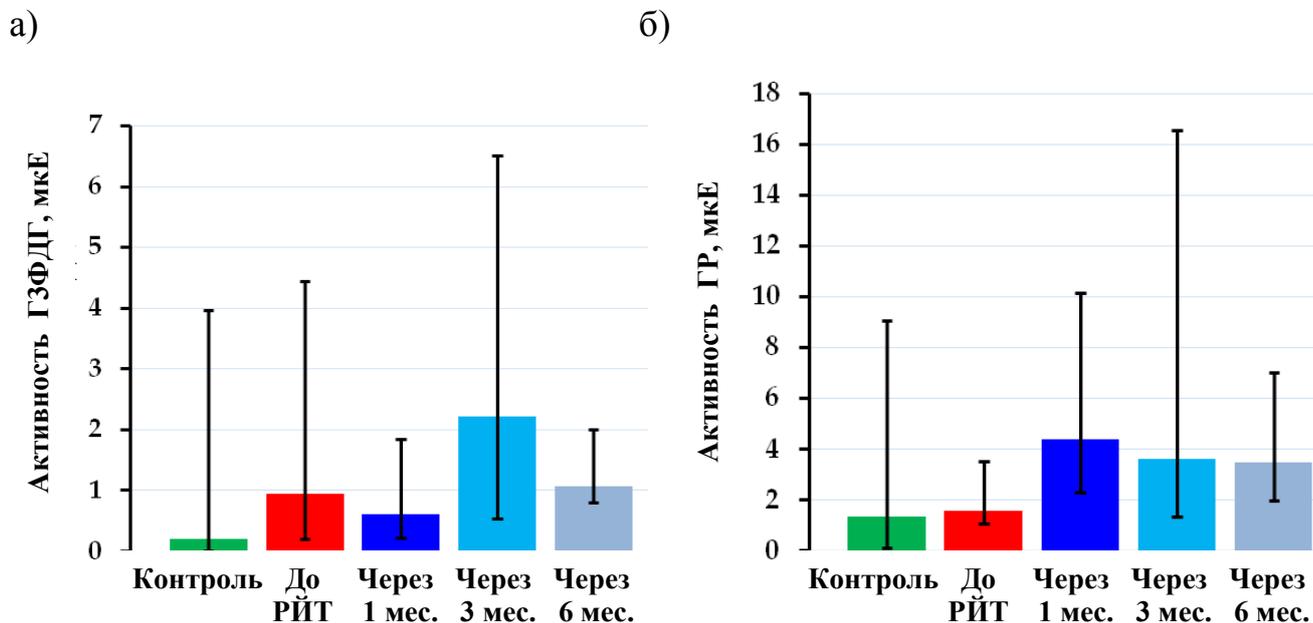


Рисунок 20 – Активность НАД-зависимой ГЗФДГ и ГР нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения

При исследовании взаимосвязей между активностью НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови и показателями тиреоидного статуса в контрольной группе выявлялись отрицательные связи между уровнем ТТГ и НАДН-ГДГ, и концентрацией свТ4 и НАДН-МДГ, соответственно, $r = -0,64$, $p = 0,024$ и $r = -0,61$, $p = 0,033$, а также положительная связь между уровнем свТ4 и активностью ГР, $r = 0,69$, $p = 0,012$. У пациентов с болезнью Грейвса, как до, так и в динамике после радионуклидного лечения данные взаимосвязи не прослеживались.

Таким образом, иммунологическая ремиссия болезни Грейвса после радионуклидного лечения связана с потерей антигенной стимуляции, с последующим снижением уровней антител к рТТГ, понижением клеточно-опосредованной иммунореактивности в системе продукции первичных АФК и адаптационными изменениями метаболизма клеток иммунной системы.

СПОСОБ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ВЫБОРУ МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ В ДЕБЮТЕ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

Одной из задач исследования являлась разработка способа персонафицированного подхода к выбору метода лечения болезни Грейвса в дебюте заболевания. Основной проблемой, решаемой при помощи разработанного способа, являлся ранний прогноз эффективности консервативного, оперативного и радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания, с использованием метода проточной цитометрии.

На основании установленных клинико-иммунологических маркеров прогрессирования аутоиммунного процесса у пациентов с болезнью Грейвса разработан способ персонафицированного подхода к выбору метода лечения в дебюте заболевания, включающий в себя расчет коэффициента В-клеточной регуляции (ВКР), который основан на вычислении процентного соотношения активированных В-лимфоцитов к общей фракции Treg (ВКР = активированные В-лимфоциты / общая фракция Treg) (таблица 43, рисунок 21).

Таблица 43 – ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза эффективности консервативного, оперативного и радионуклидного лечения в дебюте болезни Грейвса

Коэффициент	AUC	Оптимальное значение	Чувствит., %	Специф., %	p
CD19 ⁺ CD23 ⁺ / Treg	1,0	0,75	100	100	0,0001
CD19 ⁺ CD23 ⁺ / Treg	1,0	1,33	100	100	0,0001
CD19 ⁺ CD23 ⁺ / Treg	1,0	0,29	100	100	0,0001

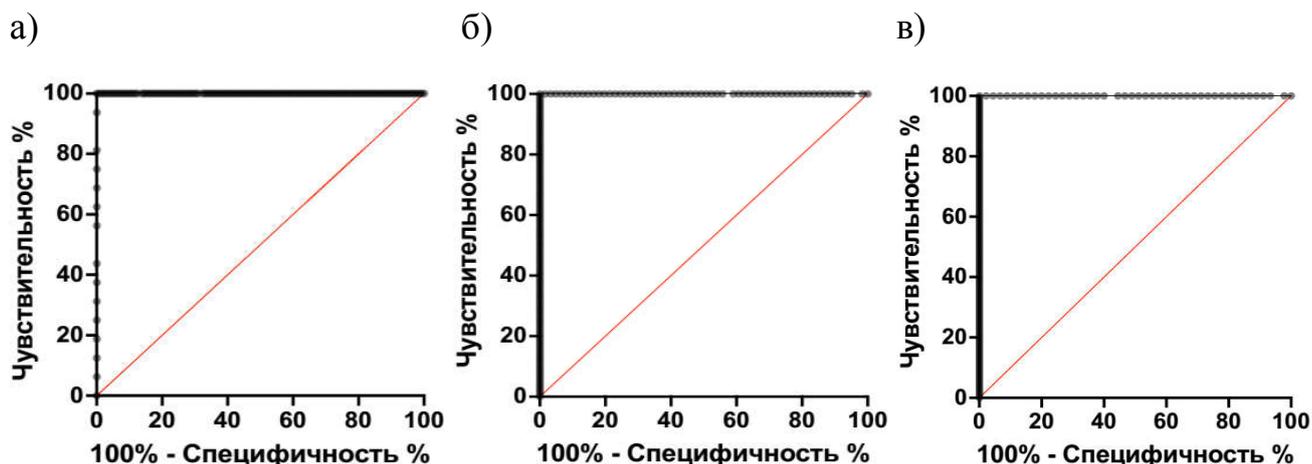


Рисунок 21 – ROC-кривая значения коэффициента ВКР и исхода консервативного, оперативного и радионуклидного лечения болезни Грейвса. а – консервативное лечение тиамазолом; б – оперативное лечение; в – радионуклидное лечение

При значении ВКР равном и ниже 0,74 выбирали радионуклидное лечение, при значении ВКР от 0,75 до 1,32 выбирали консервативное лечение тиамазолом и при значении ВКР равном и выше 1,33 – оперативное. Все значения ВКР получены опытным путем, на основании сопоставления значений рассчитываемого коэффициента в дебюте заболевания и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса. Период наблюдения осуществляется во временном интервале с момента постановки диагноза и через 1, 3 и 6 месяцев, и включает в себя динамическое наблюдение с оценкой функции щитовидной железы, фенотипического состава Т- и В-лимфоцитов в периферической крови до, и в исходе выбранного, на основании рассчитанного коэффициента ВКР, метода лечения заболевания, с последующим анализом его эффективности.

Способ прогноза реализуется следующим образом. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, на момент постановки диагноза, забирают венозную кровь (для анализа достаточно 100 мкл) свободным током в пробирки с ЭДТА. Образец 100 мкл крови вносят в пробирку проточного цитофлуориметра и для прокрашивания общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) и активированных В-лимфоцитов ($CD19^+CD23^+$) вносят моноклональные антитела (в количестве указанных производителем).

Например, CD45-ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), CD3-PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), CD4-PE (phycoerythrin), CD25-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5)CD127-AA700 (alexafluor 700), CD23-AA750 (alexafluor 750) и CD19-FITC (fluoresceinisothiocyanate). Пробирка помещается в темное место на 15 минут, затем в пробирку вносят 1 мл лизирующего раствора (например, VersaLyse (Beckman Coulter, США)) и снова помещают в темное место на 15 минут. Анализ прокрашенных клеток осуществляют на любом проточном цитофлуориметре (например, Navios, BeckmanCoulter, США). Для обеспечения высокой точности анализа и исключения погрешности в каждой пробе необходимо проанализировать не менее 50000 лимфоцитов, что определит высокий уровень достоверности прогноза эффективности того или иного метода лечения в ранний период болезни Грейвса. Затем рассчитывают коэффициент ВКР: $ВКР = \frac{\text{активированные В-лимфоциты}}{\text{общая фракция Treg}}$. При значении ВКР равном и ниже 0,74 выбирают радионуклидное лечение, при значении ВКР от 0,75 до 1,32 выбирают консервативное лечение тиамазолом и при значении ВКР равном и выше 1,33 – оперативное.

Данный способ апробирован на 21 пациенте с впервые выявленной болезнью Грейвса. По результатам обследования пациентов с болезнью Грейвса по заявленному способу установлено, что для 15 больных (71,00 %) прогнозируется эффективность радионуклидного лечения. У всех этих пациентов величина коэффициента ВКР была равной или ниже 0,74. Для 4 больных (19,00 %) была спрогнозирована эффективность оперативного лечения, коэффициент ВКР у них был равным или выше 1,33. Для 2 больных (10,00 %) была спрогнозирована эффективность длительной консервативной терапии тиамазолом. У этих пациентов величина ВКР была от 0,75 до 1,32. По результатам дальнейшего клинического наблюдения установлено совпадение прогноза в 100% случаев.

Таким образом, разработанный способ информативен, отвечает современным требованиям к методам клинико-лабораторной диагностики, позволяет персонализированно осуществить прогноз эффективности выбранного метода лечения у пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания и может быть рекомендован для применения в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь Грейвса является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием, которое развивается вследствие потери иммунологической толерантности, образования аутоантител к рТТГ и является наиболее распространенной причиной стойкого гипертиреоза у взрослых [7, 27, 72]. Традиционные методы лечения в курации пациентов с болезнью Грейвса, включая консервативную терапию тиамазолом, хирургическое лечение и ^{131}I , практически не изменились за последние 70 лет [363]. Частота рецидивов гипертиреоза после прекращения приема анти тиреоидных препаратов достигает 70-85%, а гипотиреоз, развившийся после тиреоидэктомии или лечения ^{131}I , у пациентов с болезнью Грейвса не только приводит к необходимости пожизненной заместительной терапии гормонами щитовидной железы, но и не влияет на нарушенную супрессорную функцию Treg, дефект которых лежит в основе иммунологической толерантности при гипертиреозе Грейвса [213]. Недостаточная изученность иммунопатогенетических механизмов, приводящих к индукции рецидива гипертиреоза, спонтанного гипо- и эутиреоза у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии, а также иммуномодулирующих эффектов тиамазола на системный и интратиреоидный аутоиммунный процесс являются важной научной и клинической проблемой, так как существенно ограничивают разработку иммуотропной терапии заболевания [25, 123, 19].

В связи с вышеизложенным, проведено исследование сопряженности регуляторных влияний избытка тиреоидных гормонов на фенотипический состав лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы при консервативной терапии тиамазолом, а также после хирургического, и радионуклидного лечения, их роли в детерминации тиреоидно-метаболических изменений при болезни Грейвса, что позволило раскрыть фундаментальные механизмы регуляции метаболизма и функции иммунных клеток тиреоидными гормонами, и установить приоритетные прогностические клинико-иммунологические маркеры, позволяющие определять активность аутоиммунного процесса и, соответственно, не только прогнозировать

рецидив, но и создать персонифицированный подход к выбору метода лечения в дебюте заболевания.

С учетом поставленных цели и задач было проведено комплексное клинико-иммунологическое исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы, а также уровня продукции АФК и активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса и при рецидиве заболевания, а также в динамике после консервативного, хирургического, и радионуклидного лечения.

Полученные данные демонстрируют, что рТТГ является основным специфическим и патогенетически значимым антигеном, первичное иммунное взаимодействие с которым при болезни Грейвса приводит к вторичным иммунным реакциям. Само присутствие антител к рТТГ в крови больных определяет инициацию и последующее развитие аутоиммунного процесса, как у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, так и с рецидивом заболевания. Механизм рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса, вероятно, определяется не степенью повышения уровня антител к рТТГ, а непосредственной циркуляцией тиреоидспецифических антител к рТТГ в периферической крови больных. Выявленная закономерность в продукции антител к рТТГ и ТПО у пациентов с болезнью Грейвса при длительном медикаментозном эутиреозе указывает на то, что для последующего развития заболевания присутствие антител к рТТГ необходимо на любой стадии процесса. Установлено, что уровень антител к ТПО > 100 мЕд/л в дебюте гипертиреоза Грейвса связан с выраженными изменениями клинико-иммунологических показателей и пропорционален объему тиреоидной паренхимы. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л, напротив, интенсивность аутоиммунного процесса реализуется на уровне иммунотиреоидных взаимодействий и появлением взаимосвязей титра антител к ТПО с параметрами Т- и В-клеточного иммунитета при минимальных изменениях показателей иммунного статуса.

Можно заключить, что титр антител к ТПО в дебюте гипертиреоза Грейвса является одной из детерминант различного течения аутоиммунного процесса, независимо от уровня антител к рТТГ. По мере прогрессирования аутоиммунного процесса и развития рецидива заболевания антитела к ТПО, вероятно, в большей степени участвуют в опосредовании цитотоксических реакций и иммунной агрессии, являясь чувствительным маркером генерализованной аутоиммунной дисфункции, независимо от компенсации гипертиреоза, а также длительности эутиреоидного состояния при консервативной терапии тиамазолом.

Установленный повышенный титр антител к рТТГ и ТПО у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным гипертиреозом на фоне поддерживающей дозы тиамазола является отражением инерционного механизма активации иммунной системы в дебюте заболевания с последующим каскадным процессом образования тиреоидспецифических антител к рТТГ и ТПО. Причем, процесс антителообразования против рТТГ и ТПО при болезни Грейвса, вероятно, носит непрерывный характер и не зависит от ликвидации гипертиреоза и наличия стойкого медикаментозного эутиреоза при длительной консервативной терапии тиамазолом, в случае сохранения тиреоидной ткани. Обнаружено, что положительный титр антител к рТТГ и ТПО у пациентов с болезнью Грейвса определяется и после устранения антигенного стимула – через 6 месяцев после тиреоидэктомии и радионуклидного лечения, что с одной стороны свидетельствует о перенесенной органоспецифической иммунной атаке, но, с другой стороны открывает перспективы для дальнейшего изучения различных пептидных эпитопов рТТГ и ТПО, а также их иммуногенных свойств, которые могут иметь значение не только при аутоиммунной агрессии и деструкции тиреоцитов Th-клетками, но и участвовать в механизмах ремиссии болезни Грейвса.

Избыток свободных радикалов и метаболизм клеток иммунной системы играет важную роль в повреждении тканей, вызванном гипертиреозом, так как вызывает структурное повреждение клеток, подрывая стабильность генома, и связан, как с инициацией, так и с прогрессированием аутоиммунного процесса при болезни Грейвса [139].

Количественная оценка реактивности, фазности ответных реакций в образовании первичных и вторичных АФК, а также уровня активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса на разных стадиях развития аутоиммунного процесса значимы не только для оценки их роли в механизмах рецидива заболевания, но и для изучения влияния консервативной терапии тиамазолом на функционально-метаболические показатели клеток иммунной системы. Впервые представлены особенности генерации АФК в нейтрофилах крови у пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, независимо от степени тяжести гипертиреоза, установлены значительные нарушения в системе генерации и тиреоидной регуляции образования вторичных АФК, особенно в стимулированных нейтрофилах. В дебюте болезни Грейвса, как у пациентов с субклиническим, так и с манифестным гипертиреозом взаимосвязи между показателями генерации АФК нейтрофилов и тиреоидными гормонами теряются, но появляются отрицательные корреляции уровня цитотоксических антител к ТПО со скоростью (T_{max}) и максимальным уровнем синтеза (I_{max}) вторичных АФК в стимулированных нейтрофилах. Учитывая органозависимый аутоиммунный процесс при болезни Грейвса, который сопровождается выходом активированных клеток иммунной системы из кровеносного русла и их миграцией в ткань щитовидной железы, а также выявленный высокий уровень генерации вторичных АФК при функциональной активации клеток, можно заключить, что с увеличением титра антител к ТПО в дебюте заболевания количество активированных нейтрофилов в периферической крови будет снижаться.

Впервые показано, что регуляторное влияние гиперфункции щитовидной железы в дебюте заболевания направлено на стимуляцию субстратного потока по ЦТК и отражает реакцию клеток врожденного иммунитета на функционально-регуляторный сигнал при развитии гипертиреоза. Установленный высокий уровень образования АФК у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса при отсутствии статистически значимого компенсаторного повышения активности фермента ГР, от уровня которого зависит восстановление окисленного глутатиона, свидетельствует о недостаточной активности антиоксидантных процессов и биотранс-

формации ксенобиотиков в гипертиреоидную фазу заболевания. Более того, нейтрофилы, истощенные по глутатиону, не стимулируют полноценные эффекторные функции NK-клеток [326].

Рецидив гипертиреоза, в отличие от дебюта болезни Грейвса, сопровождается не только значительным увеличением суммарного синтеза вторичных АФК, но и интенсификацией базальной и стимулированной продукции кислородных радикалов, а также снижением компенсаторных возможностей нейтрофилов в генерации соотношения пула вторичных АФК при антигенном воздействии на клетку. Участие интенсивной генерации АФК в развитии рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса подтверждается и в срыве иммунологической толерантности с повышением суммарного синтеза АФК нейтрофилами на фоне двухнедельной отмены тиамазола и позволяет отнести АФК к важным факторам прогрессирования аутоиммунного процесса. Выявленные взаимосвязи между уровнем антител к рТТГ и суммарной продукцией вторичных АФК, а также свТЗ и максимальным уровнем синтеза вторичных АФК в стимулированных нейтрофилах у пациентов с рецидивом болезни Грейвса доказывают согласованное участие антител к рТТГ и АФК в реактивации аутоиммунного процесса при болезни Грейвса. Впервые показано, что при рецидиве болезни Грейвса активность ферментов пластического и аминокислотного обмена нейтрофилов крови связана с функционированием НАДФН-оксидазного комплекса и базальным уровнем генерации вторичных АФК, и, следовательно, определяет функциональные возможности нейтрофилов при прогрессировании аутоиммунного процесса.

Таким образом, проведено комплексное клинико-иммунологическое обследование пациентов с болезнью Грейвса на фоне впервые выявленного заболевания и при рецидиве гипертиреоза. Охарактеризован уровень продукции АФК и метаболизм нейтрофилов при выраженной активации аутоиммунного процесса. При сопоставимом титре аутоантител к рТТГ у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса, как с субклиническим, так и с манифестным гипертиреозом, одного только их присутствия недостаточно для развития и поддержания персистирующих механизмов аутоиммунного воспаления.

Выявленные изменения функционально-метаболических показателей нейтрофилов могут влиять не только на развитие их полноценного цитопатогенного эффекта при инициации аутоиммунного процесса и при рецидивировании заболевания, но и помогают наметить дальнейшие пути разработки подходов для иммунотропной терапии заболевания.

Многовариантность органоспецифических изменений при болезни Грейвса представляет собой результат интегрированных взаимодействий лимфоцитов, мигрировавших непосредственно в ткань железы и инфильтрировавших ее с тиреоцитами, которые приобрели способность аберрантно экспрессировать широкий спектр молекул клеточной адгезии HLA I и II класса, что обуславливает сложность не только клинической интерпретации особенностей аутоиммунного процесса при болезни Грейвса, но и состояния интратиреоидного иммунитета после проведенного консервативного лечения тиамазолом, что ограничивает разработку иммунотропной терапии заболевания [5, 10, 341].

Настоящее исследование позволило впервые охарактеризовать в сравнительном аспекте фенотипический состав Т- и В-лимфоцитов периферической крови и ткани щитовидной железы, а также оценить иммуномодулирующее влияние консервативной терапии тиамазолом на состояние интратиреоидного аутоиммунитета. Выявленное снижение Treg в периферической крови при соответствии их низкого уровня в крови содержанию в ткани щитовидной железы отражает тяжелый дефект Treg, независимый от содержания Th-клеток, компенсации гипертиреоза и предшествующей консервативной терапии тиамазолом. Кроме того, у пациентов с болезнью Грейвса в периферической крови повышено содержание В1-клеток, но в ткани щитовидной железы количество В1-клеток снижено. Количество активированных В-лимфоцитов, экспрессирующих CD23-маркер в крови у пациентов с болезнью Грейвса снижено относительно контрольных значений. В ткани щитовидной железы выявляется еще более выраженное снижение процентного числа активированных В-клеток по сравнению с уровнем, установленным у пациентов с болезнью Грейвса в крови. Установленное повышение числа В-клеток памяти в ткани щитовидной железы, относительно их уровней, выявленных в крови, а также увеличение

активированных В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+CD23^+$) в ткани щитовидной железы относительно их низкого уровня в периферической крови в сравнении с контрольными величинами у пациентов с болезнью Грейвса отражает остаточные явления активного интратиреоидного аутоиммунного процесса и доказывает миграцию В-клеток памяти обоих типов в ткань щитовидной железы. Этим может объясняться и пониженный уровень активированных В-клеток памяти в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после тиреоидэктомии.

Впервые установлены особенности интратиреоидного аутоиммунитета у пациентов с болезнью Грейвса в дебюте и при рецидиве заболевания. Показано, что у пациентов с рецидивом болезни Грейвса, в сравнении с показателями пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса в ткани щитовидной железы увеличено количество Тreg, цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) и В-клеток памяти, но снижено число активированных Т-лимфоцитов и Th-клеток, а также В1-клеток, что доказывает иммуномодулирующий эффект длительной консервативной терапии тиамазолом, учитывая его избирательное накопление в щитовидной железе. Выявленные множественные взаимосвязи количества Тreg и активированных Th-клеток с общими В-лимфоцитами, В2-клетками и наивными В-лимфоцитами в крови при полном исключении Тreg из системы взаимосвязей с Th-клетками и активированными В-лимфоцитами в ткани щитовидной железы позволяют заключить, что у пациентов с болезнью Грейвса наблюдается не только снижение содержания Тreg в крови, но и нарушение их функциональной активности.

Установленная прямая взаимосвязь между уровнем Тreg в крови и ткани щитовидной железы подтверждает генерализованный регуляторный дефект Тreg у пациентов с болезнью Грейвса и позволяет отнести данную субпопуляцию клеток к возможным мишеням для иммуотропной терапии заболевания.

Эффективный контроль аутоиммунного воспаления при болезни Грейвса предопределяет необходимость уточнения иммунологических критериев прогрессирования заболевания на фоне длительной консервативной терапии тиамазолом для разработки современной стратегии иммуотропной терапии.

Проведено клинико-иммунологическое обследование пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от продолжительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом. Установлены механизмы адаптационных изменений в иммунной системе у пациентов с болезнью Грейвса при длительной консервативной терапии тиамазолом, которые не зависят от титра циркулирующих антител к рТТГ.

Закономерное повышение субпопуляции активированных Th-клеток сохраняется у пациентов с болезнью Грейвса с длительностью медикаментозного эутиреоза более года при консервативном лечении тиамазолом. У пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев отмечается компенсаторное повышение Treg, а общее количество Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) восстанавливается до уровня контроля. Можно заключить, что количество Treg в периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса повышается с увеличением длительности медикаментозного эутиреоза, но, несмотря на увеличение Treg, процент активированных Th-клеток остается высоким независимо от продолжительности эутиреоидного состояния и титра антител к рТТГ при консервативном лечении тиамазолом, что свидетельствует о стойком нарушении регуляторной функции Treg и создает потенциал для реактивации аутоиммунного процесса.

Настоящее исследование существенно дополняет представления о дисрегуляции рецептор-опосредованного апоптоза и развитии адаптивного иммунитета при болезни Грейвса на фоне медикаментозного лечения тиамазолом. Показано, что при приеме тиамазола у пациентов с болезнью Грейвса повышение числа Th-клеток, несущих маркер ранней активации $CD25^+$, наблюдается уже в первой фазе терапии и может отражать потенциальный механизм генерализованной иммунологической толерантности тиреоцитов от атаки T-лимфоцитами. Этот факт приводит к утверждению важной роли Fas-опосредованного апоптоза не только интратиреоидных лимфоцитов, но и периферических аутореактивных T-лимфоцитов при болезни Грейвса независимо от компенсации гипертиреоза [34].

Полученные новые данные о фенотипическом составе T-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эути-

реоза при консервативном лечении тиамазолом демонстрируют необходимость разработки иммуотропной терапии, мишенью для которой должен быть суммарный регуляторный дефект неспецифических и антигеноспецифических Treg, вследствие которого их супрессорная функция активируется в меньшей степени.

На основании исследования фенотипического состава T- и B-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса до и в динамике консервативного лечения тиамазолом разработан способ прогнозирования развития рецидива при планировании длительного консервативного лечения в дебюте болезни Грейвса, заключающийся в оценке общей фракции T-лимфоцитов и активированных B1-лимфоцитов (патент РФ № 2778614 от 22.08.2022). При сопоставлении значений, полученных в ходе исследования и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса разработан коэффициент B1-клеточной активации (B1КА), который основан на расчете процентного соотношения активированных B1-лимфоцитов к общей фракции T-лимфоцитов, то есть $B1КА = \frac{\text{активированные B1-лимфоциты}}{\text{общая фракция T-лимфоцитов}}$. Доказано, что при значении B1КА в дебюте болезни Грейвса равном и выше 0,018 прогнозируется рецидив при консервативном лечении тиамазолом, при значении B1КА ниже 0,018 прогнозируется стойкая и длительная ремиссия.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в динамике консервативного лечения тиамазолом не только сохраняется регуляторный дефект Treg, но и не ингибируется образование кислородных радикалов, что является значимым, так как уровень АФК и инициация иммунного ответа при рецидиве заболевания тесно связаны [201].

Высокий системный уровень образования первичных и вторичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса на фоне поддерживающей дозы тиамазола при продолжительности консервативной терапии 5 – 8 и 9 – 12 месяцев может являться не только дополнительным индикатором прогрессирования аутоиммунного процесса и рецидива гипертиреоза, но и раскрывает ограничения иммуномодулирующих эффектов антитиреоидных препаратов, определяя дальнейшие пути разработки подходов для иммуотропной терапии заболевания.

Как свидетельствуют полученные данные, полного восстановления обмена высокоэнергетических оксидантов у пациентов с болезнью Грейвса при разной продолжительности медикаментозного эутиреоза не происходит. Даже при длительности эутиреоза более 12 месяцев уровень продукции вторичных АФК остается повышенным относительно контрольного диапазона. Выявленные закономерности интенсификации базальной и стимулированной радикал-продуцирующей активности нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса при продолжительности медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев могут вносить дополнительный вклад в поддержание патологического иммунного ответа, как на уровне щитовидной железы, так и системно. Вероятно, интенсификация образования АФК и дефект Treg вносят сопоставимый вклад в процесс рецидивирования заболевания и создают патофизиологический порочный круг, поддерживающий персистенцию аутоиммунного процесса. Научно обоснован и тот факт, что у пациентов с болезнью Грейвса с продолжительностью медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев, несмотря на снижение уровня антител к рТТГ, генерация первичных АФК является самостоятельным механизмом, способным продолжать иммунную атаку с развитием рецидива гипертиреоза.

Полученные результаты позволяют заключить, что высокий уровень продукции АФК при длительном эутиреоидном состоянии может активировать каскад образования провоспалительных цитокинов и оказывать повреждающее действие, как на клетки иммунной системы, так и на тиреоциты, способствуя усугублению дефекта первичной иммунорегуляции Treg с последующей реактивацией аутоиммунного процесса и рецидивом заболевания. Следовательно, выявленные изменения в продукции АФК у пациентов с болезнью Грейвса при длительном эутиреоидном состоянии могут являться одним из механизмов прогрессирования аутоиммунного процесса и позволяют рассматривать связывание избытка кислородных радикалов в нейтрофилах периферической крови как один из путей дальнейшей разработки подходов для иммуотропной терапии заболевания.

Состояние регуляторного дефекта Treg, связанные с ним субпопуляции В-клеток и влияние снижения антигенной нагрузки на иммунную систему у пациен-

тов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии остается малоизученным, но может раскрывать мишени для разработки иммуотропной терапии заболевания [258]. Исходно высокий уровень антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса до тиреоидэктомии свидетельствует о том, что ликвидация отрицательных влияний гипертиреоза на иммунную систему и достижение медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом не обеспечивает восстановление в системе иммунорегуляции.

Следует подчеркнуть, что выявленный повышенный титр общей фракции антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после оперативного лечения может содержать иммуноглобулины, блокирующие стимулирующий эффект ТТГ и тем самым принимать участие в развитии гипотиреоза [16]. Но, в то же время, некоторые авторы отмечают, что, рецидив после субтотальной резекции щитовидной железы может быть связан с сохранением достаточного объема паренхимы, способной реагировать на стимулирующие антитела к рТТГ, и того количества лимфоцитов, способных продолжать иммунную атаку [341]. Настоящее исследование демонстрирует, что даже после тиреоидэктомии и радикального устранения основной массы лимфоцитов, продуцирующих антитела к рТТГ, сохраняется пониженный системный уровень Treg, который может определять их низкий потенциал в дальнейшей реализации регуляторной функции.

Впервые показано, что у пациентов с болезнью Грейвса уже в дооперационном периоде снижено абсолютное количество Treg, тогда как их процентное содержание в этот период соответствует контрольным значениям. Можно предположить, что подобное соотношение абсолютного и относительного количества Treg характеризует повышенный уровень миграции T-клеток при сохранении их субпопуляционного состава. Однако, низкий уровень наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg у пациентов с болезнью Грейвса установлен как до, так и в динамике после оперативного лечения. При этом, через 6 месяцев после тиреоидэктомии на фоне еще более выраженного понижения абсолютного количества Treg выявляется снижение процентного уровня

этих клеток и повышение числа терминально-дифференцированных Th-клеток (CD45R0⁺CD62L⁻).

Более того, через 6 месяцев после тиреоидэктомии процентное содержание общей фракции Treg и наивных Treg в крови у пациентов с болезнью Грейвса понижается по сравнению с их уровнем до операции. Выявленные изменения в содержании Treg и Th-клеток в крови у пациентов с болезнью Грейвса в этом периоде обследования совпадает с минимальной концентрацией аутоантител к рТТГ, что доказывает первичность дефекта иммунорегуляции.

Известно, что при ряде иммунопатологических состояний именно с В1-клетками связывают инициацию и поддержание аутоиммунного процесса [325]. Однако, при болезни Грейвса в качестве тиреоидстимулирующих аутоантител выступают IgG, которые синтезируются плазматическими клетками, дифференцируемыми из В2-лимфоцитов [83]. В связи с этим, сохранение повышенного уровня В2-клеток через 1 месяц после тиреоидэктомии характеризует сохранность иммунных механизмов, поддерживающих активность аутоиммунного процесса. Через 3 месяца после операции количество В2-клеток нормализуется. Показано, что через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов на фоне нормализации уровня В2-клеток выявляется снижение количества В1-клеток и В-клеток памяти, что может быть связано, как с долгосрочной активацией их миграционной способности, так и с развитием иммуносупрессивного состояния вследствие ингибирования аутоиммунного процесса. Таким образом, после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса на фоне снижения концентрации аутоантител к рТТГ в крови наблюдается сохранение низких значений абсолютного и процентного количества Treg. В целом можно заключить, что активность аутоиммунного процесса при болезни Грейвса после тиреоидэктомии снижается, но при сохранении у больных в течение длительного времени регуляторных механизмов иммуносупрессивного состояния с повышением миграционной активности клеток иммунной системы.

Полученные новые данные о восстановлении в системе продукции первичных АФК у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии отражают степень ингибирования клеточно-опосредованного врожденного имму-

нитета после устранения органа-мишени. Однако через 6 месяцев после тиреоидэктомии, на фоне повышенного суммарного уровня продукции вторичных АФК сохраняется высокая активность НАДФ-зависимых ГДГ и ИЦДГ в нейтрофилах крови, что свидетельствует об остаточных явлениях патологического процесса на системном уровне и раскрывает слабые позиции в системе гуморально-клеточной кооперации и метаболизма клеток иммунной системы.

Впервые показано, что радионуклидное лечение угнетает интенсивность синтеза, но при сохранении высокой базальной и стимулированной суммарной продукции первичных и вторичных АФК. Ингибирование аутоиммунного процесса у пациентов с болезнью Грейвса после РЙТ приводит к снижению субстратного потока по ЦТК и активации адаптационных изменений метаболизма клеток иммунной системы, направленных на интенсификацию аминокислотного обмена.

Настоящее исследование добавляет новые сведения о недостатках иммунной регуляции до и в динамике после лечения ^{131}I , и открывает отдельные субпопуляции Treg и В-клеток, количественный дефект которых определяется, как исходно, так и после радионуклидного лечения.

На основании полученных данных, можно предположить, что радионуклидное лечение у пациентов с болезнью Грейвса вызывает два терапевтически важных изменения иммунного ответа на антигены щитовидной железы. Они могут быть охарактеризованы, как реакция первой фазы и реакция второй фазы. Первоначальное воздействие ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса приводит к гибели клеток щитовидной железы и высвобождению антигенов в кровотоки. В связи с этим, через месяц после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса наблюдается повышение уровней клеточно-опосредованной иммунореактивности к рТТГ и его пептидным эпитомам, что проявляется в увеличении процентного числа общей фракции Th-клеток и уровня экспрессии активационного маркера CD23 на общей фракции В-лимфоцитов и отражает нарушенную регуляторную функцию Treg.

Сниженное процентное число наивных и терминально-дифференцированных Treg у пациентов с болезнью Грейвса, выявленное до РЙТ определяется и через месяц после радионуклидного лечения, что подтверждает сохранение, как количест-

венного, так и иммунорегуляторного дефекта Treg у пациентов с болезнью Грейвса через месяц после радионуклидного лечения.

Однако, воздействие ^{131}I на общую фракцию активированных В-лимфоцитов ($\text{CD19}^+\text{CD23}^+$), В2-клеток ($\text{CD19}^+\text{CD5}^-\text{CD23}^+$) и наивных активированных В-клеток памяти ($\text{CD19}^+\text{CD27}^-\text{CD23}^+$) через месяц после лечения можно охарактеризовать, как иммуносупрессивное.

С увеличением периода времени от воздействия ^{131}I у пациентов с болезнью Грейвса происходит постепенное уменьшение количества разрушенной ткани щитовидной железы и антигенной стимуляции с последовательным снижением уровня антител и клеточно-опосредованной иммунореактивности к рТТГ. Это представляет собой вторую фазу реакции на ^{131}I с эффектами, резко отличающимися от реакций первой фазы в связи с тем, что эта фаза связана с потерей антигенной стимуляции и восстановлением общей фракции Th- и большинства фракций В-клеток до уровня контроля. Количественный дефект в процентном уровне наивных и терминально-дифференцированных Treg у пациентов с болезнью Грейвса, выявленный до РЙТ проявляется еще большим снижением данных клеточных субпопуляций через 3, и 6 месяцев после радионуклидного лечения. Причем, низкий уровень наивных и терминально-дифференцированных Treg у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения выявляется, несмотря на прогрессивное снижение титра антител к рТТГ, которое наблюдается с первого месяца после терапии ^{131}I , что свидетельствует о сохранении количественного дефекта Treg независимо от терапевтического воздействия ^{131}I и устранения антигенного стимула.

Выявленные пониженные субпопуляции наивных и терминально-дифференцированных Treg, а также низкое абсолютное число Treg у пациентов с болезнью Грейвса до радионуклидного лечения и еще большее их снижение через 6 месяцев после радионуклидного лечения доказывает иммуносупрессивное воздействие ^{131}I на систему адаптивного иммунитета. Через 6 месяцев после радионуклидного лечения дополнительно появляются явления иммуносупрессивного воздействия терапии ^{131}I на процентное содержание общей фракции Treg и Treg эффекторной памяти, при исходно нормальном их содержании. Следует отметить, что

у пациентов с болезнью Грейвса количество Treg центральной и эффекторной памяти сохраняется в диапазоне нормальных значений в течение длительного времени, что может объясняться резистентностью данных субпопуляций Treg к воздействию ^{131}I в сравнении с остальными исследуемыми клеточными субпопуляциями.

Длительное сохранение в диапазоне нормальных значений субпопуляций Treg памяти обоих типов у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения может объясняться их длительным периодом циркуляции в периферическом кровотоке, а также эффекторными свойствами и степенью дифференцировки [224]. Восстановление до контрольных значений абсолютного и относительного числа общей популяции Th-клеток, а также большинства субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после радионуклидного лечения может реализовываться в ингибировании аутоиммунного процесса.

Впервые выявлен устойчивый дефект в количественном составе В-клеток памяти и активированных В-клеток памяти у пациентов с болезнью Грейвса, который определяется, как исходно, так и после терапии ^{131}I , но не изменяется в зависимости от сроков наблюдения в пострadiационном периоде, что свидетельствует о системном истощении В-клеток памяти у пациентов с болезнью Грейвса. В свою очередь, нормализация субпопуляции наивных В-клеток ($\text{CD}19^+\text{CD}27^-$) в исходе РЙТ является иммуносупрессивным механизмом перераспределения субпопуляций В-клеток в сторону незрелых форм, которые имеют более длинный митотический цикл и период полужизни [289].

Таким образом, у пациентов с болезнью Грейвса уже до проведения РЙТ выявляется снижение абсолютного количества Treg и процентного содержания В-клеток памяти. При анализе содержания различных субпопуляций Treg у больных установлено понижение уровня наивных Treg, по-видимому, за счет нарушения процессов дифференцировки в тимусе, и терминально-дифференцированных Treg за счет процессов созревания и выживаемости на периферии. При исследовании особенностей экспрессии активационного рецептора CD23 на В-клетках установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса в крови до РЙТ повышается количество

активированных В2-лимфоцитов и наивных В-клеток, но при снижении содержания В-клеток памяти.

При этом уровень антител к рТТГ у пациентов с болезнью Грейвса в состоянии субклинического гипертиреоза до РЙТ положительно связан с числом активированных В1-клеток и В2-клеток, что представляется дополнительным доказательством не только сохраняющегося дефекта Treg, несмотря на длительную предшествующую терапию тиамазолом, но и роли гипертиреоза, как такового, в определении рецидива заболевания, демонстрируя сильную связь этих субпопуляций В-лимфоцитов с реактивацией аутоиммунного процесса.

Изменения в субпопуляционном составе Treg и В-лимфоцитов у пациентов с болезнью Грейвса после РЙТ могут быть обусловлены, как снижением тиреоидного влияния на иммунитет, так и непосредственным действием ^{131}I на клетки иммунной системы. Можно также предположить, что в данном случае у пациентов с болезнью Грейвса проявляется и разная чувствительность Т- и В-лимфоцитов к ^{131}I , в конечном счете реализующаяся в нарушениях кооперативного взаимодействия при развитии иммунного ответа после радионуклидного лечения. При данном комплексном воздействии на иммунную систему только на 3 месяце после РЙТ выявляется дисбаланс в интегрированных взаимодействиях между количеством Treg и В-лимфоцитами и только на 6 месяце проявляются иммунологические особенности, характеризующие нарушения в механизмах аутоиммунного процесса при болезни Грейвса.

Следует подчеркнуть, что снижение процентного числа активированных В1-клеток, В-клеток памяти и активированных В-клеток памяти проявляется независимо от предшествующей консервативной терапии тиамазолом и последующего радионуклидного лечения и определяется, также, через 6 месяцев после воздействия ^{131}I , что позволяет отнести эти субпопуляции В-лимфоцитов к маркерам, которые, вероятно, играют существенную роль в персистенции аутоиммунного процесса и тесно связаны с установленным сохраняющимся первичным дефектом иммунорегуляции.

На основании исследования фенотипического состава клеток иммунной системы у пациентов с болезнью Грейвса до и в динамике после радионуклидного лечения разработан способ прогнозирования эффективности РЙТ, заключающийся в оценке количества активированных Th-клеток и общей фракции В-лимфоцитов (патент РФ № 2791390 от 07.03.2023). При сопоставлении значений, полученных в ходе исследования и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса, был рассчитан коэффициент Т-хелперной регуляции (ТХР), который основан на вычислении процентного соотношения активированных Th-клеток к процентному количеству общей фракции В-лимфоцитов, то есть $ТХР = \text{активированные Th-клеток} / \text{общая фракция В-лимфоцитов}$. Было доказано, что при значении ТХР ниже 0,105 прогнозируется развитие стойкого пострадиационного гипотиреоза через 6 месяцев после радионуклидного лечения, при значении ТХР равном и выше 0,105 прогнозируется отсутствие стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе радионуклидного лечения.

В результате комплексного исследования отдельных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов и установленной дисрегуляции механизмов иммунологической толерантности у пациентов с болезнью Грейвса были определены клинико-иммунологические маркеры, ассоциированные с прогрессированием аутоиммунного процесса. На основании выявленного дисбаланса в содержании отдельных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов разработан способ персонифицированного подхода к выбору метода лечения в дебюте болезни Грейвса включающий в себя расчет разработанного коэффициента В-клеточной регуляции (патент РФ № 2794815 от 25.04.2023). При сопоставлении значений, полученных в ходе исследования и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса был рассчитан коэффициент В-клеточной регуляции (ВКР), представляющий собой соотношение активированных В-лимфоцитов к общей фракции Treg ($ВКР = \text{активированные В-лимфоциты} / \text{общая фракция Treg}$). Было доказано, что у пациентов в дебюте болезни Грейвса при значении ВКР равном и ниже 0,74 прогнозируется эффективность радионуклидного лечения, при значении ВКР от 0,75 до 1,32 прогнозируется эффективность длительной консервативной терапии тиам-

золом, при значении ВКР равном и выше 1,33 прогнозируется эффективность оперативного лечения.

В свете новых полученных данных, генетически детерминированное состояние иммунологической толерантности у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии и радионуклидного лечения ассоциировано с ингибированием аутоиммунного процесса и развитием иммуносупрессивного состояния, которое характеризуется снижением численности отдельных клеточных субпопуляций Т- и В-клеток у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения.

Впервые идентифицированы отдельные субпопуляции Treg, Th- и В-клеток, количественный дефект которых выявляется у пациентов с болезнью Грейвса, как на фоне консервативной терапии тиамазолом, исходно, перед оперативным и радионуклидным лечением, так и сохраняется через 6 месяцев после радикальных методов лечения заболевания. Схема изменений количества Treg, Th- и В-клеток крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от метода лечения представлена на рисунке 22 (примечание: стрелками указаны изменения относительно контрольных значений; « = » – соответствие контрольному диапазону; жирным текстом выделены сходные изменения после оперативного и радионуклидного лечения). Установлено, что субпопуляции наивных Treg, терминально-дифференцированных Treg и В-клеток памяти у пациентов с болезнью Грейвса снижены, как до, так и через 6 месяцев после оперативного, и радионуклидного лечения. Причем, у пациентов с болезнью Грейвса после радионуклидного лечения определяется еще большее снижение числа наивных и терминально-дифференцированных Treg, в сравнении с исходным уровнем, что может еще больше усугублять регуляторную функцию Treg.

Следует подчеркнуть, что у пациентов с болезнью Грейвса, получивших лечение ^{131}I , к дефектным субпопуляциям Т-клеток можно отнести и уровень Th-клеток центральной памяти, повышенный уровень которых определяется, как до, так и через 6 месяцев после радионуклидного лечения.

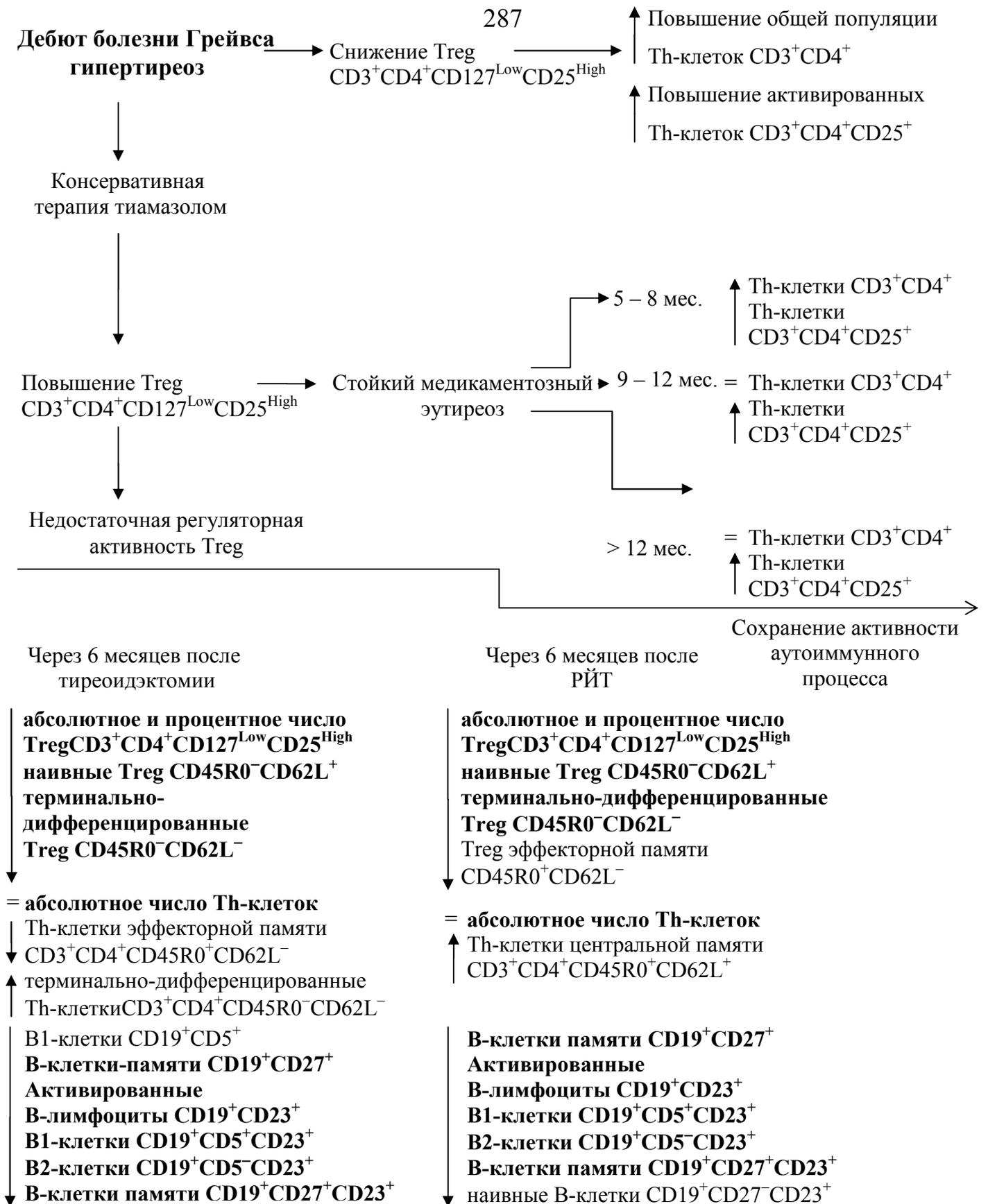


Рисунок 22 – Схема изменений количества Treg, Th- и В-клеток крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от метода лечения

Примечание. См. примечание в тексте.

Интегрированные взаимодействия отдельных субпопуляций Treg, находящихся на разных стадиях клеточной дифференцировки, и активированных В-клеток памяти с уровнем антител к рТТГ при болезни Грейвса позволяют выделить их, как иммунотиреоидные патогенетические пути, являющиеся потенциальными терапевтическими мишенями для разработки иммуотропной терапии заболевания.

Разработка генно-инженерных биологических препаратов, нацеленных на отдельные субпопуляции Treg и восстановление их регуляторного дефекта при болезни Грейвса представляется ценной не только в плане создания современного иммуотропного подхода в достижении истинной ремиссии заболевания и исключения системного иммуносупрессивного воздействия на клетки иммунной системы, но и определяет более персонализированные подходы к лечению болезни Грейвса.

Полученные результаты существенно дополнили арсенал науки сведениями об иммуномодулирующем эффекте длительной консервативной терапии тиамазолом на систему адаптивного иммунитета при болезни Грейвса. Выявленная степень исходного дисбаланса и состояние дефекта иммунологической толерантности у пациентов с болезнью Грейвса в динамике различных методов лечения позволили установить не только вектор направления иммуотропного лечения заболевания, но и сроки адаптивных изменений в системе иммунитета в зависимости от стабильности эутиреоидного состояния при длительной консервативной терапии тиамазолом. Учитывая тесную связь между уровнем АФК и инициацией иммунного ответа дальнейшее изучение данной научной проблемы должно касаться изменений показателей оксидативного стресса в аспекте состояния интратиреоидного аутоиммунитета в зависимости от силы дефекта антигенспецифических Treg.

Выявленная дисрегуляция иммунной системы вследствие первичного дефекта Treg у пациентов с болезнью Грейвса в исходе различных методов лечения открывает перспективы для изучения иммуногенетических аспектов уже имеющихся нарушений в иммунной системе больных, а также генетических аномалий тиреоцитов. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших иммуногенетических исследованиях по изучению ассоциации экспрессии HLA-DR и специфического дефекта иммунорегуляции, обусловленного аномалией генов, кодирующих ан-

тигенпрезентирующие молекулы у пациентов с болезнью Грейвса, с целью разработки генно-инженерных биологических препаратов для таргетной терапии заболевания. Выделенные отдельные субпопуляции Т- и В-клеток, уровень генерации АФК и метаболизма клеток врожденного иммунитета у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии и радионуклидного лечения позволяют не только совершенствовать фундаментальные знания об иммунопатогенезе заболевания, раскрыть их роль в детерминации тиреоидно-метаболических изменений в норме и при патологии, но и определяют перспективы дальнейшего интегрирования этих механизмов для эффективного таргетного воздействия на течение патологического процесса при разработке этиотропных терапевтических подходов к лечению.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса независимо от степени тяжести тиреотоксикоза продукция антител к рТТГ лежит в основе развития аутоиммунного процесса, но проявление иммунорегуляторного дефекта в дебюте заболевания определяется цитотоксическими антителами к ТПО. У пациентов с уровнем антител к ТПО > 100 мЕд/л повышено абсолютное число Т-лимфоцитов ($CD3^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$ -клеток), а также процентное и абсолютное количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) в крови при отсутствии статистически значимых связей содержания антител к ТПО с иммунологическими показателями. У пациентов с уровнем антител к ТПО < 100 мЕд/л, напротив, нарушения в системе иммунитета реализуются на уровне иммунотиреоидных взаимодействий с появлением в системе положительных корреляций титра антител к ТПО с относительным и абсолютным содержанием В-лимфоцитов и отрицательных с процентным количеством Т-лимфоцитов и уровнем относительного синтеза IgM.

2. При впервые выявленной болезни Грейвса значительно нарушена тиреоидная регуляция образования вторичных АФК в нейтрофилах крови, что отражается в появлении связи уровня цитотоксических антител к ТПО с кинетическими пара-

метрами люминол-зависимой индуцированной хемилюминесценции (T_{max} , I_{max}). Замедление скорости продукции вторичных АФК в стимулированных нейтрофилах указывает на компенсаторную перестройку кислородного метаболизма клеток врожденного иммунитета за счет их миграции в ткань щитовидной железы.

3. У пациентов с болезнью Грейвса, независимо от компенсации гипертиреоза, повышение суммарного синтеза (S) при снижении максимального уровня синтеза (I_{max}) вторичных АФК и прямая связь показателей S и I_{max} хемилюминесценции нейтрофилов, соответственно, с титром антител к рТТГ и уровнем свТЗ доказывает наличие сигнальной роли антител к рТТГ и регуляции кислородного метаболизма нейтрофилов свТЗ на ранней стадии реактивации аутоиммунного процесса.

4. При рецидиве болезни Грейвса, в отличие от дебюта, имеются существенные отличия в тиреоидной регуляции оксидативного статуса и метаболизма нейтрофилов. Выявленные взаимосвязи концентрации свТ4 с показателем максимального уровня синтеза вторичных АФК (I_{max}) и активностью МДГ нейтрофилов, а также повышение показателя суммарного синтеза первичных и вторичных АФК, при снижении индекса активации (Синд./Спонт.) в системе вторичных кислородных радикалов у пациентов с рецидивом болезни Грейвса характеризуют высокую цитотоксическую активность и отсутствие метаболических резервов для функциональной активации нейтрофилов.

5. Четырехкратное увеличение активности Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФ-МДГ и повышение в 3,6 раз активности НАДН-ГДГ нейтрофилов, а также выявленные прямые взаимосвязи активности Г6ФДГ и НАДФ-ГДГ с показателями суммарной продукции первичных АФК и максимального уровня синтеза вторичных АФК у пациентов с рецидивом болезни Грейвса, свидетельствуют о сигнальной роли функционально-метаболических показателей нейтрофилов в развитии рецидива заболевания.

6. Консервативная терапия тиамазолом при болезни Грейвса оказывает иммуномодулирующее действие на систему адаптивного иммунитета, которое зависит от длительности медикаментозного эутиреоза. При продолжительности эути-

реоза 5 – 8 месяцев в крови пациентов увеличивается относительное число Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) и снижается процентное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$). При большей длительности медикаментозного эутиреоза (9 – 12 месяцев) содержание Treg достигает максимума, тогда как при дальнейшем увеличении эутиреоидного состояния (более 12 месяцев) их количество в крови снижается относительно значений, выявляемых у больных с продолжительностью эутиреоза 9 – 12 месяцев, но сохраняется компенсаторно повышенным относительно контроля.

7. У пациентов с болезнью Грейвса на консервативной терапии тиамазолом уровень Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) в крови начинает снижаться только при продолжительности медикаментозного эутиреоза более 12 месяцев.

8. Длительный медикаментозный эутиреоз (более 12 месяцев) на фоне консервативной терапии тиамазолом у пациентов с болезнью Грейвса вызывает изменения в системе иммунитета, характеризующиеся восстановлением суммарного синтеза первичных АФК нейтрофилами, но выраженной активацией базального и стимулированного суммарного синтеза вторичных АФК независимо от длительности медикаментозного эутиреоза.

9. У пациентов с болезнью Грейвса с предварительно достигнутым медикаментозным эутиреозом после тиреоидэктомии, сниженное количество Treg в периферической крови соответствует их уровню в ткани щитовидной железы. Повышение в 5,8 и 1,8 раз процентного числа В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$), соответственно, экспрессирующих и не экспрессирующих активационный маркер CD23 в ткани щитовидной железы, существенно дополняет концепцию о сигнализации иммуноцитов и клеток-мишеней при болезни Грейвса и может служить основой для разработки таргетной терапии заболевания.

10. Восстановление уровня продукции первичных АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии происходит через 6 месяцев. Однако к этому времени остается пониженным число наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, а также В-клеток памяти ($CD19^+CD27^+$) при повышенном суммарном уровне

продукции вторичных АФК и сниженной активности НАДФН-ГДГ и ЛДГ в нейтрофилах, что связано с низким оттоком интермедиатов для восстановления их функциональной активности.

11. Через 6 месяцев после РЙТ у пациентов с болезнью Грейвса снижение функциональной активности нейтрофилов и восстановление до контрольных значений относительного числа наивных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD45R0^-CD62L^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD45R0^-CD62L^+$) может реализовываться в ингибировании аутоиммунного процесса. Радионуклидное лечение при болезни Грейвса вызывает дополнительное снижение содержания общей фракции Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^-$) Treg, активированных фракций В1-, В2- и наивных активированных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$), а также уровня экспрессии активационного маркера CD23 на В2-клетках и наивных В-клетках, которое определяется через 6 месяцев после РЙТ.

12. Высокий уровень Th-клеток центральной памяти ($CD3^+CD4^+CD45R0^+CD62L^+$) как до, так и в течении 6 месяцев после радионуклидного лечения при болезни Грейвса, может являться одним из механизмов поддержания аутоиммунного процесса.

13. Ингибирование аутоиммунного процесса при болезни Грейвса после оперативного и радионуклидного лечения связано с потерей антигенной стимуляции, снижением уровня антител к рТТГ, клеточно-опосредованной иммунореактивности АФК и адаптационными изменениями метаболизма нейтрофилов, но при сохранении исходного регуляторного дефекта и низкого числа наивных и терминально-дифференцированных Treg. Достижение эутиреоза на фоне консервативной терапии тиамазолом при болезни Грейвса не сопровождается полной иммунологической ремиссией заболевания. Максимальное процентное число активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD25^+$) выявляется в крови у пациентов с длительностью эутиреоза более 12 месяцев, что свидетельствует о стойком дефекте Treg, который не зависит от функции щитовид-

ной железы, титра антител к рТТГ и позволяет рассматривать выявленные дефектные субпопуляции Treg, как возможные мишени иммуотропной терапии заболевания.

14. У пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания расчет коэффициента В-клеточной регуляции, разработанного на основании выявленных механизмов прогрессирования аутоиммунного процесса, может использоваться в качестве персонифицированного подхода к выбору лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Повышенный титр антител к рТТГ при длительном консервативном лечении тиамазолом, а также после оперативного и радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса подтверждает ключевую роль рТТГ, как специфического антигена заболевания. Однако, отсутствие взаимосвязей титра антител к рТТГ с рядом важнейших клинико-иммунологических показателей у пациентов с болезнью Грейвса демонстрирует ограниченность данного маркера, как индикатора степени тяжести аутоиммунного процесса в гипертиреоидную фазу заболевания.

Возрастание титра антител к ТПО до 100 мЕд/л в дебюте болезни Грейвса является важным маркером явных изменений иммуотиреоидных взаимодействий.

Увеличение титра антител к ТПО более 100 мЕд/л у пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса является индикатором генерализованной аутоиммунной дисфункции и пропорционально объему щитовидной железы.

У пациентов с болезнью Грейвса при лечении антитиреоидными препаратами более 12 месяцев рекомендуется определять уровень активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) для оценки истинной иммунологической ремиссии и возможного рецидива заболевания перед завершением курса длительной консервативной терапии.

У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса для прогнозирования рецидива при планировании длительной консервативной терапии тиамазолом в дебюте заболевания рекомендуется определять процентное число активированных

В1-лимфоцитов($CD19^+CD5^+CD23^+$) и общую фракцию Т-лимфоцитов ($CD3^+$) с последующим расчетом коэффициента В1КА (активированные В1-лимфоциты/Т-лимфоциты). При значении 0,018 и выше прогнозируют развитие рецидива при длительном консервативном лечении, а при В1КА ниже 0,018 – развитие стойкой ремиссии заболевания.

У пациентов с болезнью Грейвса при планировании радионуклидного лечения для прогнозирования эффективности РЙТ рекомендуется определять процентное количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) и активированных Th-клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+$) с последующим расчетом коэффициента Т-хелперной регуляции (ТХР): $ТХР = \text{активированные Th-клетки} / \text{В-лимфоциты}$. При значении ТХР ниже 0,105 прогнозируют развитие стойкого пострadiационного гипотиреоза через 6 месяцев после РЙТ, при значении ТХР равном и выше 0,105 – отсутствие стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе радионуклидного лечения.

Иммуномодулирующие эффекты консервативной терапии тиамазолом зависят от продолжительности медикаментозного эутиреоза и начинают проявляться при длительности эутиреоидного состояния не менее 5 месяцев.

Для исключения реактивации аутоиммунного процесса рекомендуется через 1 месяц после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса определять состояние тиреоидного статуса в связи с зафиксированным транзиторным повышением процентного числа Th-клеток ($CD3^+CD4^+$) и уровня экспрессии активационного маркера CD23 на общей фракции В-лимфоцитов в указанном временном интервале.

У пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса рекомендуется определять процентное число активированных В-лимфоцитов и общей фракции регуляторных Т-клеток в крови с последующим расчетом их соотношения - коэффициента В-клеточной регуляции (ВКР). При значении ВКР равном и ниже 0,74 выбирать радионуклидное лечение, при значении ВКР от 0,75 до 1,32 выбирать медикаментозное лечение и при значении ВКР равном и выше 1,33 – хирургическое.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИТ	–	аутоиммунный тиреоидит
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФК	–	активные формы кислорода
ГЗФДГ	–	глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (НАД-зависимая)
Г6ФДГ	–	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГР	–	глутатионредуктаза
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
МБк	–	мегабеккерель
МДГ	–	малатдегидрогеназа
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
НАД-ГДГ	–	НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАД-ИЦДГ	–	НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа
НАДН	–	никотинамиддинуклеотид восстановленный
НАДН-ГДГ	–	НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
НАДН-ЛДГ	–	НАДН-зависимая реакция ЛДГ (анаэробная)
НАДН-МДГ	–	НАДН-зависимая реакция МДГ
НАДФ ⁺	–	никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный
НАДФ-ГДГ	–	НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДФ-ИЦДГ	–	НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа
НАДФ-МДГ	–	НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-фермент)
НАДФН	–	никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный
НАДФН-ГДГ	–	НАДФН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
ПФЦ	–	пентозофосфатный цикл
pTTH	–	рецептор тиреотропного гормона

РЙТ	–	радиойодтерапия
свТ3	–	свободный трийодтиронин
свТ4	–	свободный тироксин
ТПО	–	тиреоидная пероксидаза
ТТГ	–	тиреотропный гормон
ЦТК	–	цикл трикарбоновых кислот
ТХР	–	коэффициент Т-хелперной регуляции
В1КА	–	коэффициент В1-клеточной активации
ВКР	–	коэффициент В-клеточной регуляции
CD	–	кластер дифференцировки
HLA	–	лейкоцитарный антиген человека
HLA-DR	–	рецептор клеточной поверхности МНС класса II
Ig A, M, G	–	иммуноглобулины А, М, G
IFN- γ	–	интерферон-гамма
IL	–	интерлейкин
I _{max}	–	максимальный уровень синтеза АФК
МНС	–	главный комплекс гистосовместимости
MNC	–	мононуклеарные клетки
NK	–	натуральные клетки-киллеры
S	–	суммарный синтез АФК за 90 минут измерения
Синд./ Спонт.	–	соотношение суммарного синтеза АФК за 90 минут измерения при индуцированной и спонтанной хемилюминесценции
Th-клетки	–	Т-хелперы
T _{max}	–	скорость развития хемилюминесцентной реакции
Treg	–	регуляторные Т-клетки
TBAb	–	антитела, блокирующие щитовидную железу
TSAb	–	антитела, стимулирующие щитовидную железу

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аметов, А. С. Избранные лекции по эндокринологии: Учебное пособие / А.С. Аметов. – 3-е изд., доп. и перераб. – М. : Медицинское информационное агентство, 2016. – 720 с.
2. Антитела к рецептору ТТГ в дифференциальной диагностике токсического зоба / В. В. Фадеев, Н. А. Абрамова, С. А. Прокофьев [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51, № 4. – С. 10–18.
3. Апоптоз нейтрофилов и иммунорегуляторные цитокины при аутоиммунных тиреопатиях / О. И. Уразова, Е. Б. Кравец, В. В. Новицкий [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2007. – Т. 3, № 4. – С. 49–53.
4. Аутоантитела, иммуноглобулины и цитокиновый профиль у пациентов с болезнью Грейвса и эндокринной офтальмопатией / Н. Ю. Свириденко, Е. Г. Бес-смертная, И. М. Беловалова [и др.] // Проблемы Эндокринологии. – 2020. – Т. 66, № 5. – С. 15–23.
5. Болезни щитовидной железы. : Пер. с англ. / под ред. Л.И. Бравермана – М. : Медицина, 2000. – 432 с.
6. Гельцер, Б. И. Эволюция взглядов на патогенез аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и перспективы их таргетной терапии / Б. И. Гельцер, В. В. Здор, В. Н. Котельников // Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95, №6. – С. 524 – 534.
7. Дедов, И. И. Эндокринология 3-е издание, переработанное и дополненное / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, В. В. Фадеев // – М. : ГЭОТАР – Медиа, 2020. – 416 с.
8. Дисбаланс системы “лиганд-рецептор” фактора некроза опухолей- α и экспрессия TNFR1 в ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса / Т. В. Саприна, Т. С. Прохоренко, С. Ю. Мартынова [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 56–65.
9. Догадин, С. А. Динамика основных эпидемиологических показателей диффузного токсического зоба в Красноярском крае (2009-2018 гг.) / С. А. Догадин, М.

А. Дудина // Тез. докл. IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии». – М., 2021. – 31–32.

10. Здор, В. В. Нарушение цитокиновой регуляции и морфологические изменения щитовидной железы при экспериментальном тиреотоксикозе у крыс Вистар / В. В. Здор, Е. В. Маркелова, О. М. Олексенко // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 39–42.

11. Земсков, А. М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса / А. М. Земсков, В. М. Земсков // Клиническая и лабораторная диагностика. – 1994. – № 3. – С. 34–35.

12. Изменение некоторых цитокинов в крови у больных диффузным токсическим зобом при лечении радиоактивным йодом [Электронный ресурс] / Н. А. Захарова, О. В. Серебрякова, В. И. Просяник [и др.] // Забайкальский медицинский вестник – 2013. – №1. – С. 26–30. Режим доступа: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-1-za-2013-god/izmenenie-nekotoryh-citokinov-v-krovi-u-bolnyh-diffuznym-toksicheskim-zobom-pri-lechenii-radioaktivnym-jodom/262/5.pdf>.

13. Изменение характера течения болезни Грейвса в Санкт-Петербурге за период с 1970 по 2010 г. / С. В. Дора, Е. И. Красильникова, Е. И. Баранова [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2012. – № 2. – С. 59–63.

14. Клинические рекомендации по диагностике и лечению тиреотоксикоза с диффузным зобом (болезнь Грейвса), узловым/многоузловым зобом. – М.: РАЭ, 2021. – 50 с.

15. Кудрявцев, И. В. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа / И. В. Кудрявцев, А. И. Субботовская // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 19–26.

16. Лечение болезни Грейвса при сопутствующей эндокринной офтальмопатии / Н. Ю. Свириденко, М. С. Шеремета, И. М. Беловалова [и др.] // Вестник офтальмологии – 2021. – Т. 137, № 6. – С.128–135.

17. Натвиг, Дж. Б. Лимфоциты: выделение, фракционирование, характеристика.: Пер. с англ. – М. : Медицина, 1980. – 340 с.

18. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле / И. В. Нестерова, Н. В. Колесникова, Г. А. Чудилова [и др.] // Иммунология. – 2015. – №4. – С. 257–265.
19. Петунина, Н. А. Болезнь Грейвса – нерешенные вопросы в лечении / Н. А. Петунина, Л. В. Трухина, Н. С. Мартиросян // Доктор. Ру. – 2014. – Т. 96, № 8–2. – С. 49–53.
20. Проект федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению амиодарон-индуцированной дисфункции щитовидной железы / Е. Н. Гринева, У. А. Цой, Т. Л. Каронова [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреидология. – 2020. – Т. 16, № 2. – С. 12–24.
21. Радиоактивный йод в лечении болезни Грейвса: история и современное представление о радионуклидной терапии железы / М. С. Шеремета, М. О. Корчагина, Е. Д. Пешева, В. В. Фадеев // Терапевтический архив. – 2022. – Т. 94, № 10. – С. 1211–1215.
22. Роль полиморфизма rs12976445 гена mir125a в клиническом течении диффузного токсического зоба: ретроспективное исследование / А. Р. Волкова, Н. Э. Пейкришвили, С. В. Дора [и др.] // Фарматека. – 2020. – Т. 27, №4. – С. 64–69.
23. Савченко, А. А. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните : Монография / А. А. Савченко, Д. Э. Здзитовецкий, А. Г. Борисов. – Н. : Наука, 2013. – 142 с.
24. Савченко, А. А. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний / А. А. Савченко, И. В. Кудрявцев, А. Г. Борисов // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 327–340.
25. Савченко, А. А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом / А. А. Савченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 5. – С. 656–660.
26. Саприна, Т. В. Особенности продукции и рецепции интерлейкина-2 и интерлейкина-4 при аутоиммунных тиреопатиях / Т. В. Сапина // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 4–5. – С. 365–372.

27. Свириденко, Н. Ю. Тиреотоксикоз / Н. Ю. Свириденко // *Общая врачебная практика: национальное руководство* / Под ред. И. Н. Денисова, О. М. Лесняк. – М. : ГЭОТАР – Медиа, 2013. – Т. 1. – С. 677–689.
28. Трошина, Е. А. Аналитический обзор результатов мониторинга основных эпидемиологических характеристик йододефицитных заболеваний у населения Российской Федерации за период 2009-2018 гг / Е. А. Трошина, Н. М. Платонова, Е. А. Панфилова // *Проблемы эндокринологии*. – 2021. – Т. 67, №2. – С. 10–19.
29. Фадеев, В. В. По материалам клинических рекомендаций Европейской Тиреоидной Ассоциации по диагностике и лечению тиреотоксикоза при болезни Грейвса 2018 года / В. В. Фадеев // *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. – 2020. – Т. 16, № 1. – С. 4–20.
30. Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии тиамазолом / М. А. Дудина, С. А. Догадин, А. А. Савченко [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 39–49.
31. Чиркин, А. А. Биохимия / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко – М. : Медицинская литература, 2010. – 610 с.
32. Шагарова, С. Г. К проблеме иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы / С. Г. Шагарова // *Сибирский медицинский журнал*. – 2011. – № 1. – С. 42–45.
33. Ярилин, А. А. Иммунология / А. А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
34. A 2017 Survey of the clinical practice patterns in the management of relapsing Graves disease / S. Koren, M. Shteinshnaider, K. Or [et al.] // *Endocr. Pract.* – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 55–61.
35. A case of Hashimoto's thyroiditis following Graves' disease [Electronic resource] / I. Oueslati, S. Salhi, M. Yazidi [et al.] // *Clin. Case Rep.* – 2022. – Vol. 10, № 10. – URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.6466>.

36. A classification of Hashimoto's thyroiditis based on immunohistochemistry for IgG4 and IgG / J. Zhang, L. Zhao, Y. Gao [et al.] // *Thyroid*. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 364–370.
37. A cyclic peptide significantly improves thyroid function, thyrotropin-receptor antibodies and orbital mucine / collagen content in a long-term Graves' disease mouse model [Electronic resource] / T. Diana, M. Ungerer, C. Wüster [et al.] // *J. Autoimmun.* – 2021. – Vol. 122. – URL :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841121000743?via%3Dihub>.
38. A Global Regulatory Network for Dysregulated Gene Expression and Abnormal Metabolic Signaling in Immune Cells in the Microenvironment of Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis [Electronic resource] / H. Zheng, J. Xu, Y. Chu [et al.] // *J. Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – URL :
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.879824/full>.
39. A Modifying Autoantigen in Graves' Disease / R. Latif, M. Mezei, S. A. Morshed [et al.] // *Endocrinology*. – 2019. – Vol. 160, № 5. – P. 1008–1020.
40. A monoclonal thyroid-stimulating antibody / T. Ando, R. Latif, A. Pritsker [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 10, № 11. – P. 1667–1674.
41. Abdi, H. Antithyroid Drugs / H. Abdi, A. Amouzegar, F. Azizi // *Iran J. Pharm. Res.* – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 1–12.
42. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity / T. Hanafusa, R. Pujol-Borrell, L. Chiovato [et al.] // *Lancet*. – 1983. – Vol. 2, № 8359. – P. 1111–1115.
43. Absolute reduction in peripheral regulatory T cells in patients with Graves' disease and post-treatment recovery / H. Y. Liu, Z. Y. Shi, D. Fan [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2022. – Vol. 144. – P. 49–57.
44. Activation of thyroid antigen-reactive B cells in recent onset autoimmune thyroid disease patients / M. J. Smith, M. Rihanek, B. M. Coleman [et al.] // *J. Autoimmun.* – 2018. – Vol. 89. – P. 82–89.

45. Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases [Electronic resource] / L. Ding, X. Chen, H. Cheng [et al.] // *Front. Chem.* – 2022. – Vol. 10. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.974854/full>.
46. Advances in regulatory B cells in autoimmune thyroid diseases [Electronic resource] / S. Kang, J. Kang, H. Shen, N. Wu // *Int. Immunopharmacol.* – 2021. – Vol. 96. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34020391/>.
47. Aerobic endurance training status affects lymphocyte apoptosis sensitivity by induction of molecular genetic adaptations / K. Alack, K. Krüger, A. Weiss [et al.] // *Brain. Behav. Immun.* – 2019. – Vol. 75. – P. 251–257.
48. Aggarwal, N. T. Redox control of cardiac excitability / N. T. Aggarwal, J. C. Makielski // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 432–468.
49. Akahori, H. Graves' disease coexisted with resistance to thyroid hormone: a case report [Electronic resource] / H. Akahori, R. Usuda // *J. Med. Case Rep.* – 2021. – Vol. 15, № 1. – URL : <https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-021-03061-4>.
50. Akama-Garren, E. H. T cell help in the autoreactive germinal center [Electronic resource] / E. H. Akama-Garren, M. C. Carroll // *Scand. J. Immunol.* – 2022. – Vol. 95, № 6. – URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/sji.13192>.
51. Altered expression profile of BAFF receptors on peripheral blood B lymphocytes in Graves' disease [Electronic resource] / X. Wang, J. Huang, A. Zhang [et al.] // *BMC Endocr. Disord.* – 2021. – Vol. 21, № 1. – URL : <https://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-021-00752-3>.
52. An Investigation of Oxidative Stress and Thiol/Disulphide Homeostasis in Graves' Disease [Electronic resource] / V. Agan, H. Celik, M. A. Eren [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2019. – Vol. 55, № 6 – URL : pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31207925/.
53. Analysis of HLA Variants and Graves' Disease and Its Comorbidities Using a High Resolution Imputation System to Examine Electronic Medical Health Records [Electronic resource] / W. L. Liao, T. Y. Liu, C. F. Cheng [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.842673/full>.

54. Anti-nuclear autoantibodies in Graves' disease and Graves' orbitopathy / G. Lanzola, L. Puccinelli, M. Giudetti [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2022. – Vol. 46, № 2. – P. 337–344.
55. Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism [Electronic resource] / P. Abraham, A. Avenell, S. C. McGeoch [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2005. – Vol. 20, № 1. – URL :
<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD003420/full>.
56. Antithyroid drugs in Graves' hyperthyroidism: differences between "block and replace" and "titration" regimes in frequency of euthyroidism and Graves' orbitopathy during treatment / M. Žarković, W. Wiersinga, P. Perros [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2021. – Vol. 44, № 2. – P. 371–378.
57. Appropriate duration of antithyroid drug treatment as a predictor for relapse of Graves' disease: a systematic scoping review / F. Azizi, H. Abdi, L. Mehran [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2022. – Vol. 45, № 6. – P. 1139–1150.
58. Aranda, A. MicroRNAs and thyroid hormone action [Electronic resource] / A. Aranda // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 525. – URL :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720721000198?via%3Dihub>.
59. Architecture of the NADPH oxidase family of enzymes [Electronic resource] / B. C. Ogboo, U. V. Grabovyy, A. Maini [et al.] // *Redox Biol.* – 2022. – Vol. 52. – URL :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231722000702?via%3Dihub>.
60. Arshad, I. New-Onset Graves' Disease in the Background of Hashimoto's Thyroiditis: Spectrums of the Same Disease With Changing Autoantibodies [Electronic resource] / I. Arshad, T. Zahra, J. Vargas-Jerez // *Cureus.* – 2022. – Vol. 14, № 8. – URL :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36158389/>.
61. Arts, R. J. Immunometabolic circuits in trained immunity / R. J. Arts, L. A. Joosten, M. G. Netea // *Semin. Immunol.* – 2016. – Vol. 28, № 5. – P. 425–430.
62. Aspirin-induced apoptosis of yeast cells is associated with mitochondrial superoxide radical accumulation and NAD(P)H oxidation / G. Farrugia, W. H. Bannister, N. Vassallo [et al.] // *FEMS. Yeast Res.* – 2013. – Vol. 13, № 8. – P. 755–768.

63. Associations of FOXP3 gene polymorphisms with susceptibility and severity of preeclampsia: A meta-analysis [Electronic resource] / Y. X. Fan, J. H. Wu, S. J. Yin [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2022. – Vol. 88, № 1. – URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aji.13554>.
64. Auto-Regulation of the Thyroid Gland Beyond Classical Pathways / K. Brix, J. Szumska, J. Weber [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2020. – Vol. 128, № 607. – P. 437–445.
65. Azizi, F. Control of Graves' hyperthyroidism with very long-term methimazole treatment: a clinical trial [Electronic resource] / F. Azizi, H. Abdi, A. Amouzegar // *BMC Endocr. Disord.* – 2021. – Vol. 21, № 1: 16. – URL : <https://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-020-00670-w>.
66. Azizi, F. Long-Term Treatment of Hyperthyroidism with Antithyroid Drugs: 35 Years of Personal Clinical Experience / F. Azizi // *Thyroid.* – 2020. – Vol. 30, № 10. – P. 1451–1457.
67. Bacchetta, R. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation / R. Bacchetta, F. Barzaghi, M. G. Roncarolo // *Ann. N. Y Acad. Sci.* – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 5–22.
68. Bartalena, L. Current concepts regarding Graves' orbitopathy / L. Bartalena, M. L. Tanda // *J. Intern. Med.* – 2022. – Vol. 292, № 5. – P. 692–716.
69. Bednarek, J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy / J. Bednarek, H. Wysocki, J. Sowiński // *Clin. Biochem.* – 2005. – Vol. 38, № 1. – P. 13–18.
70. Bhalotra, R. Overlapping morphology in thyroiditis (Hashimoto's and subacute) and Grave's disease / R. Bhalotra, G. Jayaram // *Cytopathology.* – 1990. – Vol. 1, № 6. – P. 371–372.
71. Bioenergetic Aspects of Mitochondrial Actions of Thyroid Hormones [Electronic resource] / F. Cioffi, A. Giacco, F. Goglia, E. Silvestri // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, № 6. – URL : <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/6/997>.

72. Blick, C. Thyrotoxicosis [Electronic resource] / C. Blick, M. Nguyen, I. Jialal // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482216/>
73. Bobanga, I. D. Treatment of patients with Graves' disease and the appropriate extent of thyroidectomy [Electronic resource] / I. D. Bobanga, C. R. McHenry // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. – 2019. – Vol. 33, № 4. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X19300703?via%3Dihub>
74. Brief Report – Monoclonal Antibodies Illustrate the Difficulties in Measuring Blocking TSH Receptor Antibodies [Electronic resource] / T. F. Davies, S. A. Morshed, M. Mezei [et al.] // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.943459/full>.
75. Can Digit Ratio (2D:4D) Be Indicative of Predispositions to Autoimmune Thyroid Diseases in Women - Hashimoto Thyroiditis and Graves' Disease? [Electronic resource] / B. Świąchowicz, A. Kasielska-Trojan, J. T. Manning, B. Antoszewski // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.914471/full>.
76. CD11c+ B Cells Participate in the Pathogenesis of Graves' Disease by Secreting Thyroid Autoantibodies and Cytokines [Electronic resource] / Y. Cao, X. Zhao, R. You [et al.] // Front. Immunol. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.836347/full>.
77. CD4+ cells in autoimmune thyroid disease / S. Janyga, B. Marek, D. Kajdaniuk [et al.] // Endokrynol. Pol. – 2021. – Vol. 72, № 5. – P. 572–583.
78. Cellular and molecular basis of thyroid autoimmunity [Electronic resource] / J. Bogusławska, M. Godlewska, E. Gajda [et al.] // Eur. Thyroid. J. – 2022. – Vol. 11, № 1. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34981746/>.
79. Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association / R. Pujol-Borrell, D. Álvarez-Sierra, D. Jaraquemada [et al.] // Horm. Metab. Res. – 2018. – Vol. 50, № 12. – P. 863–870.

80. Cepharanthine blocks TSH receptor peptide presentation by HLA-DR3: Therapeutic implications to Graves' disease [Electronic resource] / C. W. Li, R. Osman, F. Mencioni [et al.] // *J. Autoimmun.* – 2020. – Vol. 108. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841119306973?via%3Dihub>.
81. Changes in expression of T-helper (Th) 1- and Th2-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes and plasma concentrations of their ligands, interferon-inducible protein-10 and thymus and activation-regulated chemokine, after antithyroid drug administration in hyperthyroid patients with Graves' disease / Y. Inukai, A. Momobayashi, N. Sugawara [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 156, № 6. – P. 623–630.
82. Changes in Radiosensitivity to Gamma-Rays of Lymphocytes from Hyperthyroid Patients Treated with I-131 [Electronic resource] / V. Dini, M. Salvatori, M. Belli [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 17. – URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10156>.
83. Changes in Serum Immunoglobulin G4 Levels in Patients with Newly Diagnosed Graves' Disease / I. Hiratsuka, H. Yamada, M. Itoh [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2020. – Vol. 128, № 2. – P. 119–124.
84. Changes in Th1/Th2 cytokine balance in Graves' disease / T. Kocjan, B. Wraber, U. Repnik [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2000. – Vol. 440, №5. – P. 94–95.
85. Changes in Thyrotropin Receptor Antibody Levels Following Total Thyroidectomy or Radioiodine Therapy in Patients with Refractory Graves' Disease / J. Kim, M. S. Choi, J. Park [et al.] // *Thyroid.* – 2021. – Vol. 31, № 8. – P. 1264–1271.
86. Changes of activity and kinetics of certain liver and heart enzymes of hypothyroid and T(3)-treated rats / U. Czyzewska, A. Tylicki, M. Siemieniuk [et al.] // *J. Physiol. Biochem.* – 2012. – Vol. 68, № 3. – P. 345–351.
87. Changes of IgG N-Glycosylation in Thyroid Autoimmunity: The Modulatory Effect of Methimazole in Graves' Disease and the Association With the Severity of Inflammation in Hashimoto's Thyroiditis [Electronic resource] / S. Trzos, P. Link-Lenczowski, G. Sokołowski, E. Pocheć // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.841710/full>.

88. Characterization of the nicotinamide adenine dinucleotides (NAD⁺ and NADP⁺) binding sites of the monomeric isocitrate dehydrogenases from *Campylobacter* species / P. Wang, X. Chen, J. Yang [et al.] // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 160. – P. 148–155.
89. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 10 in autoimmune diseases / A. Antonelli, S. M. Ferrari, D. Giuggioli [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – Vol. 13, № 3. – P. 272–280.
90. Chocry M. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors / M. Chocry, L. Leloup // *Antioxid. Redox Signal.* 2020. – Vol. 33, № 5. – P. 332–353.
91. Chung, J. H. Antithyroid Drug Treatment in Graves' Disease / J. H. Chung // *Endocrinol. Metab. (Seoul)*. – 2021. – Vol. 36, № 3. – P. 491–499.
92. Chung, J. H. Treatment of relapsed hyperthyroidism / J. H. Chung // *J. Korean Med. Assoc.* – 2018. – Vol. 61. – P. 248–252.
93. Clinical efficacy of thyroid-stimulating immunoglobulin detection for diagnosing Graves' disease and predictors of responsiveness to methimazole / K. Liu, Y. Fu, T. Li [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2021. – Vol. 97. – P. 34–40.
94. Clinical Significance of Coexistence of Hashimoto Thyroiditis and Graves' Disease with Differentiated and Medullary Thyroid Cancer / A. Machens, K. Lorenz, F. Weber [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2022. – Vol. 130, № 6. – P. 381–385.
95. Cohen, S. B. Antithyroid drugs ameliorate thymectomy-induced experimental autoimmune thyroiditis / S. B. Cohen, A. P. Weetman // *Autoimmunity*. – 1988. – Vol. 1, № 1. – P. 51–58.
96. Comparison of a Bridge Immunoassay with Two Bioassays for Thyrotropin Receptor Antibody Detection and Differentiation / S. Allelein, T. Diana, M. Ehlers [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 2019. – Vol. 51, № 6. – P. 341–346.
97. Comparison of Five TSH-Receptor Antibody Assays in Graves' disease: results from an observational pilot study / T. Struja, R. Jutzi, N. Imahorn [et al.] // *BMC Endocr. Disord.* – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 38.
98. Comparison of Fixed versus Calculated Activity of Radioiodine for the Treatment of Graves Disease in Adults / A. U. Canto, P. N. Dominguez, C. A. Jimeno [et al.] // *Endocrinol. Metab. (Seoul)*. – 2016. – Vol. 31, № 1. – P. 168–173.

99. Comprehensive Analysis of lncRNA Expression Profile and the Potential Role of ENST00000604491 in Graves' Disease [Electronic resource] / Y. Liu, J. Zou, J. Xu [et al.] // *J. Immunol. Res.* – 2022. – Vol. 25. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9061081/>.
100. Comprehensive immunophenotypic analysis reveals the pathological involvement of Th17 cells in Graves' disease [Electronic resource] / K. Torimoto, Y. Okada, S. Nakayamada [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – URL : <https://www.nature.com/articles/s41598-022-19556-z>.
101. Comprehensive analysis of key genes and pathways for biological and clinical implications in thyroid-associated ophthalmopathy [Electronic resource] / Y. Wang, Y. Shao, H. Zhang [et al.] // *BMC Genomics.* – 2022. – Vol. 23, №1. – URL : <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-022-08854-5>.
102. Comprehensive research on thyroid diseases associated with autoimmunity: autoimmune thyroid diseases, thyroid diseases during immune-checkpoint inhibitors therapy, and immunoglobulin-G4-associated thyroid diseases / H. Inaba, H. Ariyasu, K. Takeshima [et al.] // *Endocr J.* – 2019. – Vol. 66, № 10. – P. 843–852.
103. Concurrence of Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis / T. Sato, I. Takata, T. Taketani [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 1977. – Vol. 52, № 12. – P. 951–955.
104. Concurrent Graves' Disease and TSH Secreting Pituitary Adenoma Presenting Suppressed Thyrotropin Levels: A Case Report and Review of the Literature [Electronic resource] / J. Fu, A. Wu, X. Wang [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00523/full>.
105. Constitutive Changes in Circulating Follicular Helper T Cells and Their Subsets in Patients with Graves' Disease [Electronic resource] / Y. Liu, X. Yuan, X. Li [et al.] // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – URL : <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/8972572/>.
106. Contemporary Thyroid Nodule Evaluation and Management / G. Grani, M. Sponziello, V. Pecce [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 105, № 9. – P. 2869–2883.

107. Conversion to Graves disease from Hashimoto thyroiditis: a study of 24 patients / B. Gonzalez-Aguilera, D. Betea, L. Lutteri [et al.] // *Arch. Endocrinol. Metab.* – 2018. – Vol. 62, № 6. – P. 609–614.
108. Cooper, D. S. Antithyroid drugs / D. S. Cooper // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352, № 9. – P. 905–917.
109. Cooper, D. S. Antithyroid drugs in the management of patients with Graves' disease: an evidence-based approach to therapeutic controversies / D. S. Cooper // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88, № 8. – P. 3474–3481.
110. Critical amino acid variants in HLA-DRB1 allotypes in the development of
111. Csaba, G. Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T(3)) concentration in immune cells / G. Csaba, E. Pállinger // *Inflamm. Res.* 2009. – Vol. 58, № 3. – P.151–154.
112. Current controversies in the management of Graves' hyperthyroidism / N. Francis, T. Francis, J. H. Lazarus, O. E. Okosieme // *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 15, № 3. – P. 159–169.
113. Davies, T. F. Editorial: TSH Receptor and Autoimmunity [Electronic resource] / T. F. Davies, R. Latif // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2019. – Vol. 10. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00019/full>.
114. Davies, T. F. Thyroid Eye Disease: A New Name, A New Guide, and A New Era / T. F. Davies // *Thyroid*. – 2022. – Vol. 32, № 12. – P.1434–1436.
115. Davies, T. F. Nongenomic actions of thyroid hormone / P. J. Davis, F. Goglia, J. L. Leonard // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 111–121.
116. Davies, T. F. Targeting the thyroid-stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies / T. F. Davies, R. Latif // *Expert Opin Ther Targets.*–Vol. 2015. – Vol. 19, № 6. – P. 835–847.
117. De Leo, S. Hyperthyroidism / S. De Leo, S. Y. Lee, L. E. Braverman // *Lancet*. – 2016. – Vol. 388, № 10047. – P. 906–918.
118. Decrease of intrathyroidal CD161+Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in Graves' disease / M. Watanabe, Y. Nakamura, F. Matsuzuka [et al.] // *Endocr J.* – 2008. –Vol.55, № 1. – P. 199-203.

119. Decreased serum interleukin-41/Metrnl levels in patients with Graves' disease [Electronic resource] / L. Gong, G. Huang, L. Weng [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2022. – Vol. 36, № 10. – URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24676>.
120. Decreased Treg Cell and TCR Expansion Are Involved in Long-Lasting Graves' Disease [Electronic resource] / Z. Chen, Y. Liu, S. Hu [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12, № 12. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.632492/full>.
121. Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate / S. B. Solerte, S. Precerutti, C. Gazzaruso [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 152, № 5. – P. 703–712.
122. Diagnostic Values of Free Triiodothyronine and Free Thyroxine and the Ratio of Free Triiodothyronine to Free Thyroxine in Thyrotoxicosis [Electronic resource] / X. Chen, Y. Zhou, M. Zhou [et al.] // *Int. J. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 2018. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29971103/>.
123. Diana, T. Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies / T. Diana, P. D. Olivo, G. J. Kahaly // *Horm. Metab. Res.* – 2018. – Vol. 50, № 12. – P. 853–862.
124. Differential distribution and prognostic value of CD4+ T cell subsets before and after radioactive iodine therapy in differentiated thyroid cancer with varied curative outcomes [Electronic resource] / Z. Y. Shi, S. X. Zhang, C. H. Li [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.966550/full>.
125. Differential expression of Fas system apoptotic molecules in peripheral lymphocytes from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis / S. Fountoulakis, G. Vartholomatos, N. Kolaitis [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 158, № 6. – P. 853–859.
126. Disturbed Th1 and Th2 balance in patients with Graves' disease / Y. Eshaghkhani, M. H. Sanati, M. Nakhjavani [et al.] // *Minerva Endocrinol.* – 2016. – Vol. 41, № 1. – P. 28–36.

127. Dithiothreitol-Lucigenin Chemiluminescent System for Ultrasensitive Dithiothreitol and Superoxide Dismutase Detection / A. Abdussalam, Y. Chen, F. Yuan [et al.] // *Anal. Chem.* – 2022. – Vol. 94, № 31. – P. 11023–11029.
128. Duntas, L. H. Block-and-replace vs. titration antithyroid drug regimen for Graves' hyperthyroidism: two is not always better than one / L. H. Duntas // *J. Endocrinol. Invest.* – 2021. – Vol. 44, № 6. – P. 1337–1339.
129. Dustin, M. L. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion / M. L. Dustin, T. A. Springer // *Annu. Rev. Immunol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 27–66.
130. Dynamic modulation of Ca²⁺ sparks by mitochondrial oscillations in isolated guinea pig cardiomyocytes under oxidative stress / L. Zhou, M. A. Aon, T. Liu [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – Vol. 51, № 5. – P. 632–639.
131. Effect of Addition of Thyroxine in the Treatment of Graves' Disease: A Systematic Review [Electronic resource] / J. Li, L. Bai, F. Wei [et al.] // *J. Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021 – Vol. 11. – URL :
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.560157/full>.
132. Effects of recombinant human interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha with or without interferon-gamma on human thyroid tissues from patients with Graves' disease and from normal subjects xenografted into nude mice / Y. Kasuga, S. Matsubayashi, F. Akasu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1991. – Vol. 72, № 6. – P.1296–1301.
133. Efficacy of radioactive iodine treatment of Graves' hyperthyroidism using a single calculated ¹³¹I dose [Electronic resource] / K. K. Wong, B. L. Shulkin, M. D. Gross, A. M. Avram // *Clin. Diabetes Endocrinol.* – 2018. – Vol. 4. – URL :
<https://clindiabetesendo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40842-018-0071-6>.
134. Ehlers, M. Graves' disease in clinical perspective / M. Ehlers, M. Schott, S. Allelein // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. – 2019. – Vol. 24, № 1. – P. 35–47.
135. Ekpebegh, C. Graves' disease following hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis in a black South African lady: a case report [Electronic resource] / C. Ekpebegh, K. Elmezughi, L. Mtingi // *Pan. Afr. Med. J.* – 2019. – Vol. 32. – URL :
<https://panafrican-med-journal.com/content/article/32/186/full/>.

136. El Kawkgi, O. M. Comparison of long-term antithyroid drugs versus radioactive iodine or surgery for Graves' disease: A review of the literature / O. M. El Kawkgi, D. S. Ross, M. N. // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2021. – Vol. 95, № 1. – P. 3–12.
137. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase / M. T. Elnakish, H. H. Hassanain, P. M. Janssen // *J. Pathol.* – 2013. – Vol. 231, № 3. – P. 290–300.
138. Endocrine disruptors and thyroid autoimmunity [Electronic resource] / S. Benven-ga, G. Elia, F. Ragusa Paparo [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 34, № 1. – URL :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X2030004X?via%3Dihub>.
139. Energy metabolism and oxidative status of rat liver mitochondria in conditions of experimentally induced hyperthyroidism / N. I. Venediktova, O. V. Mashchenko, E. Y. Talanov // *Mitochondrion*. – 2020. – Vol. 52. – P. 190–196.
140. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease-real life data / Y. S. Hussain, J. C. Hookham, A. Allahabadia [et al.] // *Endocrine*. – 2017. – Vol. 56, № 3. – P. 568–578.
141. Espinosa, J. R. In Vitro Differentiation of CD4+ T Cell Effector and Regulatory Subsets / J. R. Espinosa, J. D. Wheaton, M. Ciofani // *Methods. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 2111. – P. 79–89.
142. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism / M. Aslan, N. Co-sar, H. Celik [et al.] // *Endocrine*. – 2011. – Vol. 40, № 2. – P. 285–289.
143. Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cells in au-toimmune thyroid disease / T. F. Davies, A. Martin, E. S. Concepcion [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 325, № 4. – P. 238–244.
144. Evidence that TSH Receptor A-Subunit Multimers, Not Monomers, Drive Antibod-y Affinity Maturation in Graves' Disease / B. Rapoport, H. A. Aliesky, C. R. Chen [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2015. – Vol. 100, № 6. – P. 871–875.
145. Exceptional hyperthyroidism and a role for both major histocompatibility class I and class II genes in a murine model of Graves' disease [Electronic resource] / S. M.

McLachlan, H. A. Aliesky, C. R. Chen [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – URL : <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021378>.

146. Excessive Cytosolic DNA Fragments as a Potential Trigger of Graves' Disease: An Encrypted Message Sent by Animal Models [Electronic resource] / Y. Luo, A. Yoshihara, K. Oda [et al.] // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2016. – Vol. 7. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2016.00144/full>.

147. Exercise in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: harmful or harmless? A narrative review [Electronic resource] / K. Georgakouli, I. G. Fatouros, D. Draganidis [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – URL : pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31089417/.

148. Exploring Systemic Autoimmunity in Thyroid Disease Subjects [Electronic resource] / T. Siriwardhane, K. Krishna, V. Ranganathan [et al.] // J. Immunol. Res. – 2018. – Vol. 2018. – URL : <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/6895146/>.

149. Exposure to 3,3',5-triiodothyronine affects histone and RNA polymerase II modifications, but not DNA methylation status, in the regulatory region of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor β A gene / K. Kasai, N. Nishiyama, Y. Izumi // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2015. – Vol. 467, № 1. – P. 33–38.

150. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on human thyroid cells from patients with autoimmune thyroid disease: study of thyroid xenografts in nude and severe combined immunodeficient mice and treatment with FK-506 / G. Arreaza, N. Yoshikawa, T. Mukuta [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1995. – Vol. 80, № 12. – P. 3724–3731.

151. Extranuclear effects of thyroid hormones and analogs during development: An old mechanism with emerging roles [Electronic resource] / S. Incerpi, F. Gionfra, R. De Luca [et al.] // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.961744/full>.

152. Fadeyev V. Clinical Aspects of Thyroid Disorders in the Elderly. Thyroid International. – 2007. – № 3. – P. 4–15.

153. Fas ligand expression in thyroid follicular cells from patients with thionamide-treated Graves' disease / N. Mitsiades, V. Poulaki, S. Tseleni-Balafouta [et al.] // Thyroid. – 2000. – Vol. 10, № 7. – P. 527–532.

154. Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease / N. Sera, A. Kawakami, T. Nakashima [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2001. – Vol. 124, № 2. – P. 197–207.
155. Foyer, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis / C. H. Foyer // *Environ. Exp. Bot.* – 2018. – Vol. 154. – P. 134–142.
156. Foyer, C. H. ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts / C. H. Foyer, G. Hanke // *Plant J.* – 2022. – Vol. 111, № 3. – P. 642–661.
157. fT3:fT4 ratio in Graves' disease – correlation with TRAb level, goiter size and age of onset / M. Minasyan, A. Dulęba, A. Smalarz [et al.] // *Folia Med. Cracov.* – 2020. – 60, № 2. – P. 15–27.
158. Genetic predictors of the development and recurrence of Graves' disease / D. Vejrazkova, J. Vcelak, E. Vaclavikova [et al.] // *Physiol. Res.* – 2018. – Vol. 67, № 3. – P. 431–439.
159. Genetic study in a large cohort supported different pathogenesis of Graves' disease and Hashimoto's hypothyroidism [Electronic resource] / Q. Y. Zhang, W. Liu, L. Li [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 105, № 7. – URL : pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32246145/.
160. Genetics and epigenetics of autoimmune thyroid diseases: Translational implications [Electronic resource] / H. J. Lee, M. Stefan-Lifshitz, C. W. Li [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2022. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X22000483?via%3Dihub>.
161. Genetics, Epigenetics, Cellular Immunology, and Gut Microbiota: Emerging Links With Graves' Disease [Electronic resource] / F. Zhou, X. Wang, L. Wang [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2022. – Vol. 9. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.794912/full>.
162. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism / P. N. Taylor, D. Albrecht, A. Scholz [et al.] // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 14, № 5. – P. 301–316.

163. Graves' disease [Electronic resource] / T. F. Davies, S. Andersen, R. Latif [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primers.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – URL : <https://www.nature.com/articles/s41572-020-0184-y>.
164. Graves' disease: Epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses [Electronic resource] / A. Antonelli, S. M. Ferrari, F. Ragusa [et al.] // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020 – Vol. 34, № 1. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32107168/>.
165. Graves' disease: Introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors / J. L. Wémeau, M. Klein, J. L. Sadoul [et al.] // *Ann. Endocrinol. (Paris).* – 2018. – Vol. 79, № 6. – P. 599–607.
166. Guan, H. X. What's new in the 2016 American Thyroid Association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis. – 2017. – Vol. 56, № 10. – P. 785–788.
167. Hamilton, L. O. W. Total thyroidectomy for Graves' disease-what do our patients think? A qualitative cohort study to evaluate the surgical management of Graves' disease / L. O. W. Hamilton, A. E. Lim, L. J. Clark // *Surgeon.* – 2020. – Vol. 18, № 4. – P. 193–196.
168. Hashimoto's thyroiditis following Graves' disease / H. Umar, N. Muallima, J. M. Adam [et al.] // *Acta Med. Indones.* – 2010. – Vol. 42, № 1. – P. 31–35.
169. Hepatocellular carcinoma in viral and autoimmune liver diseases: Role of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in the immune microenvironment / A. Granito, L. Muratori, C. Lalanne [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2021. – 27, № 22. – P. 2994–3009.
170. Herrero-Cervera, A. Neutrophils in chronic inflammatory diseases / A. Herrero-Cervera, O. Soehnlein, E. Kenne // *Cell. Mol. Immunol.* – 2022. – Vol. 19, № 2. – P. 177–191.
171. High Levels of Thyroid Hormone Impair Regulatory T Cell Function Via Reduced PD-1 Expression / Y. Zhong, T. T. Lu, X. M. Liu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2021. – Vol. 106, № 9. – P. 2738–2753.
172. High levels of thyroid hormones promote recurrence of Graves' disease via overexpression of B-cell-activating factor [Electronic resource] / S. Liu, J. J. Miao, X. Zhou [et

al.] // J. Clin. Lab. Anal. – 2022. – Vol. 36, № 10. – URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcla.24701>.

173. High neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with relapse in Graves' disease after antithyroid drug therapy / M. Kim, B. H. Kim, M. H. Jang [et al.] // Endocrine. – 2020. – Vol. 67, № 2. – P. 406–411.

174. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms / D. R. Sutherland, F. Ortiz, G. Quest [et al.] // Cytometry. B. Clin. Cytom. – 2018. – Vol. 94, № 4. – P. 637–651.

175. Histometry of lymphoid infiltrate in the thyroid of primary thyrotoxicosis patients. Relation of extent of thyroiditis to preoperative drug treatment and postoperative hypothyroidism / R. J. Young, M. B. Sherwood, J. G. Simpson [et al.] // J. Clin. Pathol. – 1976. – Vol. 29, № 5. – P. 398–402.

176. Hormone- and antibody-mediated activation of the thyrotropin receptor / J. Duan, P. Xu, X. Luan // Nature. – 2022. – Vol. 609, № 7928. – P. 854–859.

177. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? / M. Sospedra, G. Obiols, L. F. Babi [et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 154, № 8. – P. 4213–4222.

178. Hypoxia leads to Na,K-ATPase downregulation via Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels and AMPK activation / G. A. Gusarova, H. E. Trejo, L. A. Dada [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 31, № 17. – P. 3546–3556.

179. Identification and differential regulation of microRNAs during thyroid hormone-dependent metamorphosis in *Microhyla fissipes* [Electronic resource] / L. Liu, W. Zhu, J. Liu [et al.] // BMC Genomics. – 2018. – Vol. 19, № 1. – URL : <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4848-x>.

180. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood / H. Jonuleit, E. Schmitt, M. Stassen [et al.] // J. Exp. Med. – 2001. – Vol. 193, № 11. – P. 1285–1294.

181. Identification of lncRNA and mRNA Expression Profile in Relapsed Graves' Disease [Electronic resource] / Q. Yao, Z. Song, B. Wang [et al.] // Front. Cell Dev. Biol. –

2021. – Vol. 9. – URL :

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.756560/full>.

182. Immunohistological phenotyping of thyroid infiltrating lymphocytes in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis / T. Misaki, J. Konishi, T. Nakashima [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1985. – Vol. 60, № 1. – P.104–110.

183. Immunological Drivers in Graves' Disease: NK Cells as a Master Switcher [Electronic resource] / D. Gallo, E. Piantanida, M. Gallazzi [et al.] // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2020. – Vol. 11, № 406. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00406/full>.

184. Immunometabolic signatures predict recovery from thyrotoxic myopathy in patients with Graves' disease / D. Setoyama, H. Y. Lee, J. S. Moon [et al.] // J. Cachexia Sarcopenia Muscle. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 355–367.

185. Immunotherapy with a biologically active ICAM-1 mAb and an siRNA targeting TSHR in a BALB/c mouse model of Graves' disease / X. Wang, W. Liu, Z. Rui [et al.] // Endokrynol. Pol. – 2021. – Vol. 72, № 6. – P. 592–600.

186. Impaired immune regulation after radioiodine therapy for Graves' disease and the protective effect of Methimazole / S. Coté-Bigras, V. Tran, S. Turcotte [et al.] // Endocrine. – 2016. – 52, № 3. – P. 587–596.

187. Increased Circulating Th17 but Decreased CD4+Foxp3+ Treg and CD19+CD1dhiCD5+ Breg Subsets in New-Onset Graves' Disease [Electronic resource] / J. Qin, J. Zhou, C. Fan [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2017. – Vol. 2017. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702927/>.

188. Induction of thyroid remission using rituximab in a patient with type 3 autoimmune polyglandular syndrome including Graves' disease and type 1 diabetes mellitus: a case report / A. Kurozumi, Y. Okada, T. Arao [et al.] // Endocr. J. – 2015. – Vol. 62, № 1. – P.69–75.

189. Influence of high tissue-absorbed dose on anti-thyroid antibodies in radioiodine therapy of Graves' disease patients / M. H. Listewnik, H. Piwowarska-Bilska, K. Jasiakiewicz, B. Birkenfeld // Adv. Clin. Exp. Med. – 2021. – Vol. 30, № 9. – P. 913–921.

190. Insight Into Mouse Models of Hyperthyroidism / M. Zhang, W. Jiang, G. Lu [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.929750/full>.
191. Is Graves' disease a primary immunodeficiency? New immunological perspectives on an endocrine disease / T. Struja, A. Kutz, S. Fischli [et al.] // *BMC Med.* – 2017. – Vol. 15, № 1. – P. 174.
192. Ischemia-modified albumin and malondialdehyde levels in patients with overt and subclinical hyperthyroidism: effects of treatment on oxidative stress / C. Erem, A. K. Suleyman, N. Civan [et al.] // *Endocr. J.* – 2015. – Vol. 62, № 6. – P. 493–501.
193. Jones, B. M. Effect of radioactive iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increases in interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha, with longer term increases in interferon-gamma production / B. M. Jones, C. C. Kwok, A. W. Kung // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 11. – P. 4106–4110.
194. Kahaly, G. J. TSH Receptor Antibodies: Relevance & Utility / G. J. Kahaly, T. Diana, P. D. Olivo // *Endocr. Pract.* – 2020. – Vol. 26, № 1. – P. 97–106.
195. Kim, H. J. Long-term management of Graves disease: a narrative review [Electronic resource] / H. J. Kim // *J. Yeungnam Med. Sci.* – 2022. – URL : <https://www.ejyms.org/journal/view.php?doi=10.12701/jyms.2022.00444>.
196. Klein, J. R. Novel Splicing of Immune System Thyroid Stimulating Hormone β -Subunit-Genetic Regulation and Biological Importance [Electronic resource] / J. R. Klein // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2019. – Vol. 10. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00044/full>.
197. Kristensen, B. Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls [Electronic resource] / B. Kristensen // *Dan. Med. J.* – 2016. – Vol. 63, № 2. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26836805/>.
198. Lack of effect of methimazole on thyrocyte cell-surface antigen expression / J. Aguayo, P. Michaud, M. Iitaka [et al.] // *Autoimmunity.* – 1989. – Vol. 2, № 2. – P. 133–143.

199. Lactate Is a Metabolic Mediator That Shapes Immune Cell Fate and Function [Electronic resource] / H. L. Caslin, D. Abebayehu, J. A. Pinette [et al.] // *Front. Physiol.* – 2021. – Vol. 12. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.688485/full>.
200. Lang, B. H. Two-year outcomes of single-session high-intensity focused ultrasound (HIFU) treatment in persistent or relapsed Graves' disease / B. H. Lang, Y. C. Woo, K. W. Chiu // *Eur. Radiol.* – 2019. – Vol. 29. – P. 6690–6698.
201. Lanzolla, G. Oxidative Stress in Graves Disease and Graves Orbitopathy / G. Lanzolla, C. Marcocci, M. Marinò // *Eur. Thyroid J.* – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 40–50.
202. Le, Y. Purinergic signaling in thyroid disease [Electronic resource] / Y. Le, D. Lu, M. Xue // *Purinergic Signal.* – 2022. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35347568/>.
203. LiVolsi, V. A. The Pathology of Hyperthyroidism [Electronic resource] / V. A. LiVolsi, Z. W. Baloch // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 9. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00737/full>.
204. LncRNA RUNX1-IT1 affects the differentiation of Th1 cells by regulating NrCAM transcription in Graves' disease / F. J. Huang, Y. L. Liu, J. Wang [et al.] // *Cell Cycle*. – 2022. – Vol. 21, № 9. – P. 921–933.
205. Long-term remission following antithyroid drug withdrawal in patients with Graves' hyperthyroidism: parameters with prognostic value / R. V. García-Mayor, P. Álvarez-Vázquez, E. Fluiters [et al.] // *Endocrine*. – 2019. – Vol. 63, № 2. – P. 316–322.
206. Low frequency of IL-10-producing B cells and high density of ILC2s contribute to the pathological process in Graves' disease, which may be related to elevated-TRAb levels / X. Ji, J. Wan, R. Chen [et al.] // *Autoimmunity*. – 2020. – Vol. 53, № 2. – P. 78–85.
207. Luminol functionalized tin dioxide nanoparticles with catalytic effect for sensitive detection of glucose and uric acid [Electronic resource] / R. Yang, W. Dong, Y. Ren [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2022. – Vol. 1220. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35868705/>.

208. Lytton, S. D. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioassays prevail over binding assays / S. D. Lytton, A. Schluter, P. J. Banga // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. – 2018. – Vol. 23, № 11. – P. 2028–2043.
209. Maecker, H. T. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project / H. T. Maecker, J. P. McCoy, R. Nussenblatt // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, № 3. – P. 191–200.
210. Main Factors Involved in Thyroid Hormone Action [Electronic resource] / L. Tedeschi, C. Vassalle, G. Iervasi, L. Sabatino // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 23. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8658769/>.
211. Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells / T. Eleftheriadis, G. Pissas, G. Antoniadi [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. 1959–1966.
212. Management of Feline Hyperthyroidism and the Need to Prevent Oxidative Stress: What Can We Learn from Human Research? [Electronic resource] / A. Candellone, V. Saettone, P. Badino [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – URL : <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1496>.
213. Management of Graves' hyperthyroidism: present and future / L. Bartalena, E. Piantanida, D. Gallo [et al.] // *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* – 2022. – Vol. 17, № 2. – P. 153–166.
214. Marsan, E. S. A Halogen Bonding Perspective on Iodothyronine Deiodinase Activity / E. S. Marsan, C. A. Bayse // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 6. – P. 1328.
215. Mathematical Modeling of Free Thyroxine Concentrations During Methimazole Treatment for Graves' Disease: Development and Validation of a Computer-Aided Thyroid Treatment Method [Electronic resource] / V. Theiler-Schwetz, T. Benninger, C. Trummer [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.841888/full>.
216. McAninch, E.A. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism / E. A. McAninch, A. C. Bianco // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2014. – Vol. 1311. – P. 77–87.

217. McLachlan, S. M. A Mouse Thyrotropin Receptor A-Subunit Transgene Expressed in Thyroiditis-Prone Mice May Provide Insight into Why Graves' Disease Only Occurs in Humans [Electronic resource] / S. M. McLachlan, H. A. Aliesky, B. Rapoport // *Thyroid*. – 2019. – Vol. 29, № 8. – P. 1138–1146.
218. Mechanisms in Graves Eye Disease: Apoptosis as the End Point of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Inhibition / S. A. Morshed, R. Ma, R. Latif [et al.] // *Thyroid*. – 2022. – Vol. 32, № 4. – P. 429–439.
219. Mehra, P. Thyroid cytopathology reporting by the bethesda system: a two-year prospective study in an academic institution [Electronic resource] / P. Mehra, A. K. Verma // *Patholog. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320899/>.
220. Menconi, F. Diagnosis and classification of Graves' disease / F. Menconi, C. Marocchi, M. Marinò // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – Vol. 13, № 4–5. – P. 398–402.
221. Meta-analysis reveals significant association between FOXP3 polymorphisms and susceptibility to Graves' disease [Electronic resource] / G. Tan, X. Wang, G. Zheng [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2021. – Vol. 49, № 4. – URL : <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/03000605211004199>.
222. Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease / J. Sewerynek, J. Wiktorska, D. Nowak, A. Lewinski // *Endocr. Regul.* – 2000. – Vol. 34, № 2. – P. 83–89.
223. Milling, S. Beyond cytokines: Influences of the endocrine system on human immune homeostasis / S. Milling // *Immunology*. – 2021. – Vol. 163, № 2. – P. 113–114.
224. MiR-363-5p modulates regulatory T cells through STAT4-HSPB1-Notch1 axis and is associated with the immunological abnormality in Graves' disease / X. Yin, J. Ge, X. Ge [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 25, № 19. – P. 9364–9377.
225. Mitochondrial Oxidative Stress-A Causative Factor and Therapeutic Target in Many Diseases [Electronic resource] / P. Kowalczyk, D. Sulejczak, P. Kleczkowska [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 24. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8707347/>.

226. Modulatory effect of exogenous Coenzyme Q10 on redox and inflammatory biomarkers during aging in rats / P. Srivastava, A. K. Verma, J. K. Arya, S. I. Rizvi // *Biol. Futur.* – 2022. – Vol. 73, № 4. – P. 473–481.
227. Molecular Basis of Nongenomic Actions of Thyroid Hormone / P. J. Davis, J. L. Leonard, H. Y. Lin [et al.] // *Vitam. Horm.* – 2018. – Vol. 106. – P. 67–96.
228. Moncayo, R. Applying a systems approach to thyroid physiology: Looking at the whole with a mitochondrial perspective instead of judging single TSH values or why we should know more about mitochondria to understand metabolism / R. Moncayo, H. Moncayo // *BBA Clin.* – 2017. – Vol. 7. – P. 127–140.
229. Moncayo, R. Practical Guidelines for Diagnosing and Treating Thyroid Disease Based on the WOMED Metabolic Model of Disease Focusing on Glycolysis and Coenzyme Q10 Deficiency-A Clinical Alternative to the 2021 Retired Clinical Practice Guidelines of the Endocrine Society [Electronic resource] / R. Moncayo, H. Moncayo // *Diagnostics (Basel.)*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – URL : <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/1/107>.
230. Morshed, S. A. Understanding Thyroid Cell Stress / S. A. Morshed, T. F. Davies [Electronic resource] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 105, № 3. – URL : [nml.nih.gov/pmc/articles/PMC7047584/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7047584/).
231. Murine Thyroid IL-4 Expression Worsens Hypothyroidism on Iodine Restriction and Mitigates Graves Disease Development [Electronic resource] / K. Merakchi, S. Djerbib, M. Soleimani [et al.] // *Endocrinology*. – 2022. – Vol. 163, № 9. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35881515/>.
232. Mutua, V. A. Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics / V. Mutua, L. J. Gershwin // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2021. – Vol. 61, № 2. – P. 194–211.
233. Muzza, M. Disorders of H₂O₂ generation / M. Muzza, L. Fugazzola // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 31, № 2. – P. 225–240.
234. Navarro, F. Moderate exercise increases the metabolism and immune function of lymphocytes in rats / F. Navarro, A. V. Bacurau, G. B. Pereira // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2013. – Vol. 113, № 5. – P. 1343–1352.

235. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology / A. Hidalgo, P. Libby, O. Soehnlein [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2022. – Vol. 118, № 13. – P. 2737–2753.
236. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease / L. Glennon-Alty, A. P. Hackett, E. A. Chapman [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 125. – P. 25–35.
237. New Therapeutic Horizon of Graves' Hyperthyroidism: Treatment Regimens Based on Immunology and Ingredients From Traditional Chinese Medicine [Electronic resource] / Q. He, H. Dong, M. Gong [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.862831/full>.
238. New Therapeutic Horizons for Graves' Hyperthyroidism / L. C. Lane, T. D. Cheetham, P. Perros [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2020. – Vol. 41, № 6. – P. 873–884.
239. Nitric Oxide in Life and Death of Neutrophils / S. I. Galkina, E. A. Golenkina, G. M. Viryasova [et al.] // *Curr. Med. Chem.* 2019. – Vol. 26, № 31. – P. 5764–5780.
240. Normal Anti-Thyroid Peroxidase Antibody (TPO-Ab) Titers and Active Arterial Wall Thickening among Euthyroid Individuals: A Prospective Study [Electronic resource] / Y. Shimizu, S. Y. Kawashiri, Y. Noguchi [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2022. – Vol. 11, № 3. – URL : <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/3/521>.
241. Normal range of anti-thyroid peroxidase antibody (TPO-Ab) and atherosclerosis among euthyroid population: A cross-sectional study [Electronic resource] / Y. Shimizu, S. Y. Kawashiri, Y. Noguchi [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – Vol. 99, № 38. – URL : https://journals.lww.com/mdjournal/Fulltext/2020/09180/Normal_range_of_anti_thyroid_peroxidase_antibody.54.aspx.
242. Novel therapies for thyroid autoimmune diseases: An update [Electronic resource] / S. M. Ferrari, P. Fallahi, G. Elia // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2020. – Vol. 34, № 1. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X19301174?via%3Dihub>.

243. Nystrom, H. F. Incidence rate and clinical features of hyperthyroidism in a long-term iodine sufficient area of Sweden (Gothenburg) 2003 – 2005 / H. F. Nystrom, S. Jansson, G. Berg // *Clin. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 78. – P. 768–776.
244. Observational Study on Outcomes after Radioiodine Ablation in Hyperthyroid Patients / H. Pamnani, R. Jindal, J. Khare [et al.]. // *Indian J. Endocrinol. Metab.* – 2022. – Vol. 26, № 2. – P. 149–153.
245. Ohshima, T. NADP⁺-dependent l-arginine dehydrogenase from *Pseudomonas veilonii*: Purification, characterization and application to an l-arginine assay [Electronic resource] / T. Ohshima, M. Tanaka, T. Ohmori // *Protein Expr. Purif.* – 2022. – Vol. 199. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046592822000924#!>.
246. Olivo, P. D. Commentary: Brief report - Monoclonal antibodies illustrate the difficulties in measuring blocking TSH receptor antibodies [Electronic resource] / P. D. Olivo, G. J. Kahaly // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1060280/full>.
247. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms / P. Liu, H. Cheng, S. Santiago [et al.] // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 9. – P. 1116–1120.
248. Outcomes of Graves' Disease Patients Following Antithyroid Drugs, Radioactive Iodine, or Thyroidectomy as the First-line Treatment / X. Liu, C. K. H. Wong, W. W. L. Chan [et al.] // *Ann. Surg.* – 2021. – Vol. 273, № 6. – P. 1197–1206.
249. Oxidative and genotoxic damage after radio-iodine therapy of Graves' hyperthyroidism / M. Ballardini, R. Barsacchi, L. Bodei [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2004. – Vol. 80, № 3. – P. 209–216.
250. Oxidative stress and antioxidant defense / E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen [et al.] // *World Allergy Organ. J.* – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 9–19.
251. Oxidative stress enhances the immune response to oxidatively modified catalase enzyme in patients with Graves' disease [Electronic resource] / B. Gargouri, M. Mseddi, F. Mnif [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2020. – Vol. 34, № 2. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7031633/>.

252. Paisdzior, S. What is the Role of Thyroid Hormone Receptor Alpha 2 (TR α 2) in Human Physiology? / S. Paisdzior, M. Schuelke, H. Krude // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2022. – Vol. 130, № 5. – P. 296–302.
253. Parsanathan, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Activates Endothelial Cell and Leukocyte Adhesion Mediated via the TGF β /NADPH Oxidases/ROS Signaling Pathway [Electronic resource] / R. Parsanathan, S. K. Jain // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7474>.
254. Patterns of Use, Efficacy, and Safety of Treatment Options for Patients with Graves' Disease: A Nationwide Population-Based Study / J. P. Brito, S. Payne, N. Singh Ospina [et al.] // *Thyroid.* – 2020. – Vol.30, № 3. – P. 357–364.
255. Percentage and function of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with hyperthyroidism / T. J. Jiang, X. L. Cao, S. Luan [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – Vol. 17, № 2. – P. 2137–2144.
256. Performance of Thyroid-Stimulating Immunoglobulin Bioassay and Thyrotropin-Binding Inhibitory Immunoglobulin Assay for the Diagnosis of Graves' Disease in Patients With Active Thyrotoxicosis / N. S. de Moraes, T. E. Angell, S. Ahmadi [et al.] // *Endocr. Pract.* – 2022. – Vol. 28, № 5. – P. 502–508.
257. Peripheral immunophenotyping of AITD subjects reveals alterations in immune cells in pediatric vs adult-onset AITD [Electronic resource] / Z. C. Stensland, B. M. Coleman, M. Rihanek [et al.] // *iScience.* – 2021. – Vol. 25, № 1. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004221015960>.
258. Persistent Graves' hyperthyroidism despite rapid negative conversion of thyroid-stimulating hormone-binding inhibitory immunoglobulin assay results: a case report [Electronic resource] / N. Ohara, M. Kaneko, M. Kitazawa [et al.] // *J. Med. Case Rep.* – 2017. – Vol. 11, № 1. – URL : <https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-017-1214-6>.
259. Peters, A. L. Single cell cytochemistry illustrated by the demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes / A. L. Peters, C. J. van Noorden // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1560. – P. 3–13.

260. Pokhrel, B. Graves Disease [Electronic resource] / B. Pokhrel, K. Bhusal // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448195/>.
261. Ponto, K. A. The tale of radioiodine and Graves' orbitopathy / K. A. Ponto, S. Zang, G. J. Kahaly // Thyroid. – 2010. – Vol. 20, № 7. – P. 785–793.
262. Ponzetto, A. Clinical phenotype of Graves' disease / A. Ponzetto, N. Figura // J. Endocrinol. Invest. – 2020. – Vol. 43, № 8. – P. 1163–1164.
263. Popescu, V. Post-alemtuzumab Graves' disease remitting after switch to ocrelizumab / V. Popescu, A. Beirinckx, B. Decallonne // Acta. Neurol. Belg. – 2022. – Vol. 122, № 4. – P. 1117–1120.
264. Precision Medicine in Graves' Disease and Ophthalmopathy [Electronic resource] / G. Elia, P. Fallahi, F. Ragusa [et al.] // Front. Pharmacol. – 2021. – Vol. 28, № 12. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.754386/full>.
265. Precision Medicine in Graves' Disease: CD40 Gene Variants Predict Clinical Response to an Anti-CD40 Monoclonal Antibody [Electronic resource] / L. C. Faustino, G. J. Kahaly, L. Frommer [et al.] // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2021. – Vol. 12. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34149627/>.
266. Predicting relapse of Graves' disease following treatment with antithyroid drugs / L. Liu, H. Lu, Y. Liu [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2016. – Vol. 11, № 4. – P. 1443–1458.
267. Predicting the Relapse of Hyperthyroidism in Treated Graves' Disease with Orbitopathy by Serial Measurements of TSH-Receptor Autoantibodies / M. Stöhr, M. Oeverhaus, S. D. Lytton [et al.] // Horm. Metab. Res. – 2021. – Vol. 53, № 4. – P. 235–244.
268. Predictive effect of antithyroid antibody for relapse of Graves' disease [Electronic resource] / K. Yoshizawa, K. Aso, M. Satoh [et al.] // Pediatr. Int. – Vol. 64, № 1. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33884704/>.
269. Prospective Trial of Functional Thyrotropin Receptor Antibodies in Graves Disease / G. J. Kahaly, T. Diana, M. Kanitz [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2020. – Vol. 105, № 4. – P. 1006–10014.
270. Protective Effect of Natural Antioxidant Compounds on Methimazole Induced Oxidative Stress in a Feline Kidney Epithelial Cell Line (CRFK) [Electronic resource] /

F. Girolami, A. Candellone, W. Jarriyawattanachaikul [et al.] // *Vet. Sci.* – 2021. – Vol. 8, № 10. – URL : <https://www.mdpi.com/2306-7381/8/10/220>.

271. Putative protective role of autoantibodies against the insulin-like growth factor-1 receptor in Graves' Disease: results of a pilot study / G. Lanzolla, D. Ricci, F. J. Nicolì [et al.] // *Endocrinol. Invest.* – 2020. – Vol. 43, № 12. – P. 1759–1768.

272. Radioiodine therapy of Graves' disease / A. Piccardo, M. Ugolini, V. Altrinetti [et al.] // *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2021. – Vol. 65, №2. – P. 132–137.

273. Radioiodine treatment outcome by dosimetric parameters and renal function in hyperthyroidism / J. N. Nilsson, R. Elovsson, D. Thor [et al.] // *Thyroid Res.* – 2022. – Vol. 15, № 1. – P. 8.

274. Recent advances in Graves ophthalmopathy medical therapy: a comprehensive literature review [Electronic resource] / X. Li, S. Li, W. Fan [et al.] // *Int. Ophthalmol.* – 2022. – URL : <https://link.springer.com/article/10.1007/s10792-022-02537-6>.

275. Reduced activation of suppressor T lymphocytes by specific antigens in autoimmune thyroid disease / N. Yoshikawa, T. Morita, E. Resetkova [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 1993. – Vol. 16, № 8. – P. 609–617.

276. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease / C. Salmaso, M. Bagnasco, G. Pesce [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 966. – P. 496–501.

277. Regulation of the cellular redox state and the expression of DNA methyltransferase-1 in peripheral blood mononuclear cells from patients with Graves' disease / M. Saban, M. Costilla, A. J. Klecha [et al.] // *Endocrinol. Diabetes Nutr. (Engl. Ed.)*. – 2022. – Vol. 69, № 6. – P.409–417.

278. Regulation of TSHR Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients via Two Distinct Mechanisms [Electronic resource] / A. Marín-Sánchez, D. Álvarez-Sierra, O. González [et al.] // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01695/full>.

279. Regulatory T Cells and Human Disease / S. Sakaguchi, N. Mikami, J. B. Wing [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 38. – P. 541–566.

280. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease / M. Marazuela, M. A. García-López, N. Figueroa-Vega // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, № 9. – P. 3639–3646.
281. Relapse prediction in Graves' disease: Towards mathematical modeling of clinical, immune and genetic markers / C. Langenstein, D. Schork, K. Badenhoop [et al.] // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2016. – Vol. 17, № 4. – P. 571–581.
282. Ren, X. Changes in Th9 and Th17 lymphocytes and functional cytokines and their relationship with thyroid-stimulating hormone receptor antibodies at different stages of Graves' disease [Electronic resource] / X. Ren, H. Chen // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.919681/full>.
283. Rizo-Téllez, S. A. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy [Electronic resource] / S. A. Rizo-Téllez, M. Sekheri, J. G. Filep // *Antioxidants (Basel.)*. – 2022. – Vol. 11, № 11. – URL : <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/11/2302>.
284. Role of a new bioassay for thyroid-stimulating antibodies (aequorin TSAb) in Graves' ophthalmopathy / Y. Hiromatsu, H. Eguchi, Y. Matsuo [et al.] // *Endocr. J.* – 2020. – Vol. 67, № 3. P. 347–352.
285. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases [Electronic resource] / M. Ryzewska, M. Jaromin, I. E. Pasierowska [et al.] // *Thyroid Res.* – 2018. – Vol. 11. – URL : <https://thyroidresearchjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13044-018-0046-9>.
286. Rossi, E. D. Pitfalls in Thyroid Cytopathology / E. D. Rossi, A. J. Adeniran, W. C. Faquin // *Surg. Pathol. Clin.* – 2019. – Vol. 12, № 4. – P. 865–881.
287. Russo, S. C. Deiodinases and the Metabolic Code for Thyroid Hormone Action [Electronic resource] / S. C. Russo, F. Salas-Lucia, A. C. Bianco // *Endocrinology*. – 2021. – Vol. 162, № 8. – URL : <https://academic.oup.com/endo/article/162/8/bqab059/6171212?login=false>.
288. Salas-Lucia, F. T3 levels and thyroid hormone signaling [Electronic resource] / F. Salas-Lucia, A. C. Bianco // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1044691/full>.

289. Salvi, M. B cells in Graves' Orbitopathy: more than just a source of antibodies? / M. Salvi, D. Covelli // *Eye (Lond.)*. – 2019. – Vol. 33, № 2. – P. 230–234.
290. Schepetkin, I. A. Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases / I. A. Schepetkin // *Biochemistry (Mosc.)*. – 1999. – Vol. 64, № 1. – P. 25–32.
291. Screening of Organ-Specific Autoantibodies in a Large Cohort of Patients with Autoimmune Thyroid Diseases / T. Pilli, G. Dalmazio, B. Porcelli [et al.] // *Thyroid*. – 2021. – Vol. 31, № 9. – P. 1416–1423.
292. Serum BAFF and thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid disease / J. D. Lin, Y. H. Wang, W. F. Fang [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2016. – Vol. 462. – P. 96–102.
293. Serum Levels of CXCL-13, RBP-4, and IL-6, and Correlation Analysis of Patients with Graves' Disease [Electronic resource] / Y. Hu, Y. Sun, Y. Huang [et al.] // *Emerg. Med. Int.* – 2022 – Vol. 2022. – URL : <https://www.hindawi.com/journals/emi/2022/5131846/>.
294. Serum Ratio of Free Triiodothyronine to Thyroid-Stimulating Hormone: A Novel Index for Distinguishing Graves' Disease From Autoimmune Thyroiditis [Electronic resource] / Z. Wu, Y. Zhu, M. Zhang [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 11. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.620407/full>.
295. Should radioiodine now be first line treatment for Graves' disease? [Electronic resource] / O. E. Okosieme, P. N. Taylor, C. M. Dayan // *Thyroid Res.* – 2020. – Vol. 13. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061474/>.
296. Shyamasunder, A. H. Measuring TSH receptor antibody to influence treatment choices in Graves' disease / A. H. Shyamasunder, P. Abraham // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2017. – Vol. 86, № 5. – P. 652–657.
297. Side effects of PTU and MMI in the treatment of hyperthyroidism: a systematic review and meta-analysis / W. Yu, N. Wu, L. Li [et al.] // *Endocr. Pract.* – 2020. – Vol. 26, № 2. – P. 207–217.
298. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 180–183.

299. Singh, K. IgA deficiency and autoimmunity / K. Singh, C. Chang, M. E. Gershwin // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 163–77.
300. Sinha, R.A. Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism / R. A. Sinha, B. K. Singh, P. M. Yen // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2014. – Vol. 25, № 10. – P. 538–545.
301. SLAM/SAP Decreased Follicular Regulatory T Cells in Patients with Graves' Disease [Electronic resource] / L. Geng, J. Yang, X. Tang [et al.] // *J. Immunol. Res.* – 2021. – Vol. 2021. – URL : <https://www.hindawi.com/journals/jir/2021/5548463/>.
302. Slonimsky, E. Radiotheragnostics Paradigm for Radioactive Iodine (Iodide) Management of Differentiated Thyroid Cancer / E. Slonimsky, M. Tulchinsky // *Curr. Pharm. Des.* – 2020. – Vol. 26, № 31. – P. 3812–3827.
303. Stimulatory TSH-Receptor Antibodies and Oxidative Stress in Graves Disease / T. Diana, A. Daiber, M. Oelze [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2018. – Vol. 103, № 10. – P. 3668–3677.
304. Subhan, M. A. Neutrophils as an emerging therapeutic target and tool for cancer therapy [Electronic resource] / M. A. Subhan, V. P. Torchilin // *Life Sci.* – 2021. – Vol. 285. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320521009395?via%3Dihub>.
305. Tagami, T. Characterization of apparently paradoxical thyrotropin binding inhibitory immunoglobulins with neutral bioactivity / T. Tagami, K. Moriyama // *J. Endocr. Soc.* – 2022. – Vol. 6, № 7. – P. 1–10.
306. The characteristics and clinical significance of elevated serum IgG4/IgG levels in patients with Graves' disease / Y. Deng, J. Wang, G. Zou [et al.] // *Endocrine.* – 2022. – Vol. 75, № 3. – P. 829–836.
307. The clinical phenotype of Graves' disease occurring as an isolated condition or in association with other autoimmune diseases / M. Rotondi, C. Virili, S. Pinto [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2020. – Vol. 43, № 2. – P. 157–162.
308. The effect of adding a surfeit of autologous CD8+ T cells to SCID mice after secondary xenografts of Graves' thyroid tissue / T. Mukuta, M. Nishikawa, G. Arreaza [et al.] // *Thyroid.* – 1996. – Vol. 6, № 5. – P. 429–436.

309. The effect of antithyroid drugs on osteopontin and oxidative stress in Graves' disease / M. Kocak, E. Akarsu, H. Korkmaz [et al.] // *Acta Endocrinol. (Buchar.)*. – 2019. – Vol. 15, № 2. – P. 221–224.
310. The Effect of Immunosuppression on Selected Antioxidant Parameters in Patients with Graves' Disease with Active Thyroid-Associated Orbitopathy / M. Londzin-Olesik, B. Kos-Kudla, J. Karpe [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2021. – Vol. 129, № 10. – P. 762–769.
311. The effect of methimazole on the immune system is unlikely to operate directly on T lymphocytes / M. Bagnasco, D. Venuti, G. Ciprandi [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 1990. – Vol. 13, № 6. – P. 493–499.
312. The effect of radioiodine treatment on the characteristics of TRAb in Graves' disease [Electronic resource] / Y. Fang, W. H. Du, C. X. Zhang [et al.] // *BMC Endocr. Disord.* – 2021. – Vol. 21, № 1. – URL :
<https://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-021-00905-4>.
313. The effect of radioiodine treatment on TRAb, anti-TPO, and anti-TG in Graves' disease / O. Lindgren, P. Asp, A. Sundlöv [et al.] // *Eur. Thyroid J.* – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 64–69.
314. The evaluation of selected oxidative stress parameters in patients after radioiodine treatment of hyperthyroidism / T. Owczarek, E. Kowalczyk, A. R. Poliwczak [et al.] // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2012. – Vol. 32, № 192. – P. 382–387.
315. The Frequency of Intrathyroidal Follicular Helper T Cells Varies with the Progression of Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis [Electronic resource] / Y. Cai, Z. Wang, X. Liu [et al.] // *J. Immunol. Res.* – 2022. – Vol. 2022. – URL :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8872690/>.
316. The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Equivalent in Normal and Cancerous Oral Tissues: A Scoping Review [Electronic resource] / L. Wu, S. Xu, B. Yang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 22. – URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/14096>.

317. The Keap1/Nrf2 Signaling Pathway in the Thyroid-2020 Update [Electronic resource] / C. Thanas, P. G. Ziros, D. V. Chartoumpakis [et al.] // *Antioxidants* (Basel.). – 2020. – Vol. 9, № 11. – URL : <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1082>.
318. The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a role for regulatory T cells / S. M. McLachlan, Y. Nagayama, P. N. Pichurin [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148, № 2. – P. 5724–5733.
319. The longer the antithyroid drug is used, the lower the relapse rate in Graves' disease: a retrospective multicenter cohort study in Korea / S. Y. Park, B. H. Kim, M. Kim [et al.] // *Endocrine*. – 2021. – Vol. 74, № 1. – P. 120–127.
320. The long-term follow-up of patients with thionamide-treated Graves' hyperthyroidism / S. Bandai, K. Okamura, M. Fujikawa [et al.] // *Endocr. J.* – 2019. – Vol. 66, № 6. – P. 535–545.
321. The metabolomics approach revealed a distinctive metabolomics pattern associated with hyperthyroidism treatment [Electronic resource] / M. A. Jaber, H. Benabelkamel, L. A. Dahabiyeh [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1050201/full>.
322. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases: New T lymphocytes - Cytokines circuits beyond the Th1-Th2 paradigm / Q. Li, B. Wang, K. Mu [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, № 3. – P. 2204–2216.
323. The polymorphisms in the thyroid peroxidase gene were associated with the development of autoimmune thyroid disease and the serum levels of anti-thyroid peroxidase antibody / S. Tomari, M. Watanabe, N. Inoue [et al.] // *Endocr. J.* – 2017. – Vol. 64, № 10. – P.1025–1032.
324. The relationship between thyrotropin receptor antibody levels and intrathyroid vascularity in patients with Graves' disease / S. R. Shih, J. S. Chang, L. C. Lin [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2013. – Vol. 121, № 1. – P. 1–5.
325. The Role of B1 Cells in Systemic Lupus Erythematosus [Electronic resource] / Z. She, C. Li, F. Wu [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 28, № 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.814857/full>.

326. The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity: A Review / V. Unsal, T. Dalkıran, M. Çiçek, E. Kölükçü // *Adv. Pharm. Bull.* – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 184–202.
327. The Role of Nuclear Medicine in the Clinical Management of Benign Thyroid Disorders, Part 1: Hyperthyroidism / G. Mariani, M. Tonacchera, M. Grosso [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2021. – Vol. 62, № 3. – P. 304–312.
328. The Second Antithyroid Drug Treatment Is Effective in Relapsed Graves' Disease Patients: A Median 11-Year Follow-Up Study / Y. A. Kim, S. W. Cho, H. S. Choi [et al.] // *Thyroid.* – 2017. – Vol. 27. – P. 491–496.
329. The Unusual Late-Onset Graves' Disease following Hashimoto's Related Hypothyroidism: A Case Report and Literature Review [Electronic resource] / A. Sukik, S. Mohamed, M. B. Habib [et al.] // *Case Rep. Endocrinol.* – 2020. – Vol. 2020. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7787859/>.
330. The vitamin B6-regulated enzymes PYGL and G6PD fuel NADPH oxidases to promote skin inflammation [Electronic resource] / F. J. Martínez-Navarro, F. J. Martínez-Morcillo, A. López-Muñoz [et al.] // *Dev. Comp. Immunol.* – 2020. – Vol. 108. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32126244/>.
331. Thyrocyte HLA-DR expression and interferon-gamma production in autoimmune thyroid disease / Y. Iwatani, H. C. Gerstein, M. Iitaka [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1986. – Vol. 63, № 3. – P. 695–708.
332. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers / M. P. Armengol, M. Juan, A. Lucas-Martín [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 159, № 3. – P. 861–873.
333. Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy / W. W. Yau, B. K. Singh, R. Lesmana [et al.] // *Autophagy.* – 2019. – Vol. – 15, № 1. – P. 131–150.
334. Thyroid hormone signaling in vivo requires a balance between coactivators and corepressors / K. R. Vella, P. Ramadoss, R. H. Costa-e-Sousa [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2014. – Vol. 34, № 9. – P. 1564–1575.

335. Thyroid Hormone Status Regulates Skeletal Muscle Response to Chronic Motor Nerve Stimulation [Electronic resource] / J. Zhou, D. C. Parker, J. P. White [et al.] // *Front. Physiol.* – 2019. – Vol. 10. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01363/full>.
336. Thyroid Peroxidase Antibody is Associated with Plasma Homocysteine Levels in Patients with Graves' Disease / F. Li, G. Aji, Y. Wang [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2020. – Vol. 128, №1. – P. 8–14.
337. Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) fusion proteins in Graves' disease / H. P. Holthoff, K. Uhlend, G. L. Kovacs [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2020. – Vol. 246, № 2. – P. 135–147.
338. Thyrotropin Receptor Antibody (TRAb)-IgM Levels Are Markedly Higher Than TRAb-IgG Levels in Graves' Disease Patients and Controls, and TRAb-IgM Production Is Related to Epstein-Barr Virus Reactivation / K. Kumata, K. Nagata, M. Matsushita [et al.] // *Viral Immunol.* – 2016. – Vol. 29, № 8. – P. 459–463.
339. Thyrotropin Receptor-Specific Lymphocytes in Adenovirus-TSHR-Immunized Native and Human Leukocyte Antigen-DR3-Transgenic Mice and in Graves' Disease Patient Blood / H. Degen, I. Gavvovidis, T. Blankenstein [et al.] // *Thyroid.* – 2021 – Vol. 31, № 6. – P. 950–963.
340. Thyrotropin-receptor antibodies, immunoglobulin E and antinuclear antibodies in patients with Graves' disease and graves' orbitopathy / M. Stoyanova, A. Shinkov, G. Kirilov [et al.] // *Acta Endocrinol. (Buchar.).* – 2021. – Vol. 17, № 2. – P. 194–199.
341. Total Versus Near-total Thyroidectomy in Graves Disease: Results of the Randomized Controlled Multicenter TONIG-trial / E. Maurer, K. Maschuw, A. Reuss [et al.] // *Ann. Surg.* – 2019. – Vol. 270, № 5. – P. 755–761.
342. TPO antibody status prior to first radioactive iodine therapy as a predictive parameter for hypothyroidism in Graves' disease [Electronic resource] / S. Verdickt, F. Van Nes, C. Moyson [et al.] // *Eur. Thyroid J.* – 2022. – Vol. 11, № 4. – URL : <https://etj.bioscientifica.com/view/journals/etj/11/4/ETJ-22-0047.xml>.
343. Treatment of adult Graves' disease / B. Corvilain, A. Hamy, L. Brunaud [et al.] // *Ann. Endocrinol. (Paris).* – 2018. – Vol. 79, № 6. – P. 618–635.

344. Treatment of Hyperthyroidism Reduces Systemic Oxidative Stress, as Measured by Markers of RNA and DNA Damage / C. B. Larsen, K. R. Riis, K. H. Winther [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2021. – Vol. 106, № 7. – P. 2512–2520.
345. Triiodothyronine (T3) promotes brown fat hyperplasia via thyroid hormone receptor α mediated adipocyte progenitor cell proliferation [Electronic resource] / S. Liu, S. Shen, Y. Yan // *Nat. Commun.* – 2022. – Vol. 13, № 1. – URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31154-1>.
346. TR α 2-An Untuned Second Fiddle or Fine-Tuning Thyroid Hormone Action? [Electronic resource] / G. S. Hönes, N. Härting, J. Mittag, F. J. Kaiser // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 13. – URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/13/6998>.
347. TSH receptor specific monoclonal autoantibody K1-70TM targeting of the TSH receptor in subjects with Graves' disease and Graves' orbitopathy-Results from a phase I clinical trial / J. Furmaniak, J. Sanders, P. Sanders [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2022. – Vol. 96, №6. – P. 878–887.
348. TSHR Gene Polymorphisms in the Enhancer Regions Are Most Strongly Associated with the Development of Graves' Disease, Especially Intractable Disease, and of Hashimoto's Disease / A. Fujii, N. Inoue, M. Watanabe [et al.] // *Thyroid.* – 2017. – Vol. 27, № 1. – P. 111–119.
349. TSH-receptor autoantibodies in patients with chronic thyroiditis and hypothyroidism / M. Giannone, M. Dalla Costa, C. Sabbadin [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2022. – Vol. 60, № 7. – P. 1020–1030.
350. TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study / P. Laurberg, G. Wallin, L. Tallstedt [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 158, № 1. – P. 69–75.
351. Turan, E. Evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio and hematologic parameters in patients with Graves' disease / E. Turan // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2019. – Vol. 120, № 6. – P. 476–480.
352. Unique and overlapping effects of triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) on sensory innervation of the chick cornea [Electronic resource] / M. Patel, N. T. K. Pham, E.

Ziegenhorn [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2020. – Vol. 194. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014483519306979>.

353. Variation in rates of autoimmune thyroid disease by race/ethnicity in US military personnel / D. S. McLeod, P. Caturegli, D. S. Cooper [et al.] // *JAMA.* – 2014. – Vol. 311, № 15. – P. 1563–1565.

354. Vella, K. R. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus / K. R. Vella, A. N. Hollenberg // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2017. – Vol. 458. – P. 127–135.

355. Volpé, R. Graves' disease/model of SCID mouse / R. Volpé // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 1996. – Vol. 104, № 3. – P. 37–40.

356. Volpe, R. Suppressor T Lymphocyte Dysfunction Is Important in the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disease: A Perspective / R. Volpe // *Thyroid.* – 1993. – Vol. 3, № 4. – P. 345–352.

357. Wang, M. Therapeutic effects of combination regimens including methimazole on Graves hyperthyroidism: a network meta-analysis of randomized controlled trials / M. Wang, Y. Yu // *Endocr. Pract.* – 2020. – Vol. 26, № 6. – P. 675–687.

358. Wang, X. T. Clinical mutants of humanglucose 6-phosphate dehydrogenase : impairment of NADP(+) binding affects both folding and stability / X. T. Wang, P. C. Engel // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1792, № 8. – P. 804–809.

359. Weetman, A. P. Graves' disease following immune reconstitution or immunomodulatory treatment: should we manage it any differently? / A. P. Weetman // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2014. – Vol. 80, № 5. – P. 629–632.

360. Weetman, A. P. Immunological effects of Graves' disease therapy / A. P. Weetan // *Biomed. Pharmacother.* – 1989. – Vol. 43, № 8. – P. 587–592.

361. Werner, S. C. The normal thyroid / S. C. Werner, S. H. Ingbar // *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text* / In: Braverman LE, Utiger RD, editors. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – P. 37–109.

362. When should antithyroid drug therapy to reduce the relapse rate of hyperthyroidism in Graves' disease be discontinued? / S. Park, E. Song, H. S. Oh [et al.] // *Endocrine.* – 2019. – Vol. 65, № 2. – P. 348–356.

363. Wiersinga, W. M. Graves' Disease: Can It Be Cured? / W. M. Wiersinga // *Endocrinol. Metab. (Seoul)*. – 2019. – Vol. 34, № 1. – P. 29–38.
364. Wong, M. Alternating hyperthyroidism and hypothyroidism in Graves' disease / M. Wong, W. J. Inder // *Clin. Case Rep.* – 2018. – Vol. 6, № 9. – P. 1684–1688.
365. Xun, C. Distribution Characteristics of ANA and ANCA in Patients with Hyperthyroidism / C. Xun // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. – 2021. – Vol. 21, № 11. – P. 1993–1997.
366. Ye, M. Genetic association of leukocyte telomere length with Graves' disease in Biobank Japan: A two-sample Mendelian randomization study [Electronic resource] / M. Ye, Y. Wang, Y. Zhan // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.998102/full>.
367. Yechiel, Y. [18F]FDG PET/CT snapshot of radioactive iodine-induced thyroid damage / Y. Yechiel, Z. Keidar, M. Weiler-Sagie // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2022. – Vol. 50. – P. 624–625.
368. Yoshizawa, K. Predictive effect of antithyroid antibody for relapse of Graves' disease [Electronic resource] / K. Yoshizawa, K. Aso, M. Satoh // *Pediatr. Int.* – 2022. – Vol. 64, № 1. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33884704/>.
369. Zekri, Y. An Atlas of Thyroid Hormone Receptors' Target Genes in Mouse Tissues [Electronic resource] / Y. Zekri, R. Guyot, F. Flamant // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 19. – URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11444>.
370. Zhang, X. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases [Electronic resource] / X. Zhang, N. Olsen, S. G. Zheng // *J. Autoimmun.* – 2020. – Vol. 111. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32305296/>.
371. 2016 American Thyroid Association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis / D. S. Ross, H. B. Burch, D. S. Cooper [et al.] // *Thyroid*. – 2016. – Vol. 26, № 10. – P. 1343–1421.
372. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism / G. J. Kahaly, L. Bartalena, L. Hegedüs // *Eur. Thyroid J.* – 2018. – Vol. 7, № 4. – P. 167–186.

373. 2022 Update on Clinical Management of Graves Disease and Thyroid Eye Disease / T. D. Hoang, D. J. Stocker, E. L. Chou [et al.] // *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* – 2022. – Vol. 51, № 2. – P. 287–304.