

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)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Красноярск – 2023

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Догадин Сергей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Гринева Елена Николаевна – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, директор Института эндокринологии

Платонова Надежда Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, заведующий отделом терапевтической эндокринологии

Фадеев Валентин Викторович – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, заведующий кафедрой эндокринологии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «15» ноября 2023 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 21.3.054.06 при ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва ул. Беломорская, д. 19/38 и на сайте <https://rmapo.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самсонова Любовь Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Болезнь Грейвса (диффузный токсический зоб) 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 [Аметов А.С., 2016; Дедов И.И. и соавт., 2020; Гринева Е.Н. и соавт., 2020]. В последние несколько лет изменился характер течения болезни Грейвса [Дора С.В. и соавт., 2012; Wémeau L. et al., 2018]. 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 [Петунина Н.А. и соавт., 2014; Свириденко Н.Ю. и соавт., 2020; Lee H.J., 2022]. 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% [Kim Y.A. et al., 2017; Azizi F. et al., 2020; Chung J. H. et al., 2021].

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 [Фадеев В.В., 2020; Žarković M. et al., 2021; Li X. et al., 2022]. В свою очередь, эффективность традиционной консервативной терапии болезни Грейвса определяется восстановлением функции щитовидной железы за счет антитиреоидной терапии, а не индукцией ремиссии аутоиммунного процесса [Chung J.H. et al., 2021].

В то же время, в клинической практике отсутствуют данные о специфических иммунологических маркерах, определяющих не

только целесообразность длительной консервативной терапии, но и имеющих прогностическое значение в развитии истинной иммунологической ремиссии заболевания [Langenstein C. et al., 2016]. 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 не недооценивается [Antonelli A. et al., 2014; Lane L.C. et al., 2020; Furmaniak J. et al., 2022]. Конкретных рекомендаций о прогнозировании иммунологической ремиссии после консервативного и радионуклидного лечения не существует, точно так же, как нет единых алгоритмов персонафицированного 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 [Davies T. F., 2015; Li Q et al., 2019.; Liao W.L. et al., 2022].

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 иммунотропной терапии для разработки целенаправленного подхода при персонафицированном выборе метода лечения.

Степень разработанности темы

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 [Volpe R., 1993; Wang P. et al., 2019; Liu H.Y. et al., 2022]. Связь с главным комплексом гистосовместимости, гетерогенность аутоан-

тител, взаимодействующих с рТТГ, циркулирующих в периферической крови, даже после радикальных методов лечения заболевания, определяет крайнюю сложность в прогнозировании иммунологической ремиссии болезни Грейвса [Setoyama D. et al., 2022].

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 [Kang S. et al., 2021]. 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 [Zhang X. et al., 2020]. Однако, дефект регуляторной функции различных субпопуляций Treg при болезни Грейвса требует существенного уточнения и расширения [Struja T. et al., 2019]. На современном этапе проблема разработки иммунотропных 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 [Espinosa J.R. et al., 2020].

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 [Hiratsuka I. et al., 2020; Pilli T. et al., 2021; Cai Y. et al., 2022].

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 [Lanzolla G. et al., 2020]. 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 заболевания, а также в исходе различных методов лечения болезни Грейвса [Elia G. et al., 2021]. 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 иммуностропной терапии и разработки этиотропных терапевтических подходов к лечению заболевания.

Цель исследования

Персонализировать 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 иммуотропной 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 иммуотропной 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 функции Treg и ми-

грации 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 иммунотропной 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 = активированные В1-лимфоциты/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 = активированные Т-хелперы/В-лимфоциты, что позволяет оптимизировать протокол и исключает необходимость повторного курса РЙТ (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 персонафицированного подхода к выбору метода лечения при впервые выявленной болезни Грейвса, основанный на расчете коэффициента В-клеточной регуляции (ВКР): ВКР = активированные В-лимфоциты (CD19⁺CD23⁺)/Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}), использование которого позволяет реализовать персонализированный алгоритм в выборе метода лечения в дебюте заболевания (патент РФ № 2794815 от 25.04.2023).

Методология и методы 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. 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 персонифицированного 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). 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 использованием современных статистических методов обработки медицинских данных на репрезентативном количестве наблюдений с использованием сертифицированной программы.

Проведение диссертационного исследования одобрено независимым комитетом по этике КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (протокол № 124 от 7 апреля 2016 года) и ФГБОУ ВО КрасГМУ (протокол № 72 от 9 ноября 2016 года). 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: VII Всероссийском конгрессе эндокринологов «Достижения персонализированной медицины сегодня - результат практического здравоохранения завтра», Москва (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 заседаниях 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.).

Личное участие автора в получении 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

По материалам диссертации опубликованы 53 научные работы, 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., зарегистрировано 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, выво-

дов, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации и эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница». Иммунологические исследования выполнены в лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера – обособленного подразделения ФГБНУ «ФИЦ «КНЦ СО РАН». Радионуклидное лечение проводилось на базе отделения радионуклидной терапии центра ядерной медицины ФГБУ «Федеральный Сибирский Научно-клинический Центр» ФМБА России, г. Красноярск. В одноцентровое, проспективное, когортное, открытое, контролируемое клиническое исследование включено 180 женщин с лабораторно подтвержденной болезнью Грейвса, средний возраст $43,09 \pm 12,81$ лет, от 18 до 60 лет. 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 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: узловый/многоузловой токсический зоб, беременность и период лактации, эндокринная офтальмопатия, рецидив ги-

пертиреоза 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 [Трошина Е.А. и соавт., 2021]. Рецидивом гипертиреоза считалось изменение показателей тиреоидного статуса, соответствующих критериям субклинического или манифестного гипертиреоза у обследуемых пациентов с ранее достигнутым и подтвержденным лабораторно медикаментозным эутиреозом [Kahaly G.J. et al., 2018].

Всем пациентам после верификации диагноза болезни Грейвса инициирована консервативная терапия по стандартному протоколу. При консервативной терапии у всех пациентов использовался препарат тиамазол до достижения эутиреоза перед оперативным или радионуклидным лечением, а также, у отдельных пациентов, в качестве базового длительного (12 – 24 месяца) курса лечения. В случае рецидива заболевания после достижения медикаментозного эутиреоза пациенты распределялись на радикальные методы лечения согласно критериям, установленным национальными клиническими рекомендациями. При оперативном лечении пациентам 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.

При проведении радионуклидного лечения поддерживающая доза тиамазола отменялась за 14 дней до приема раствора ^{131}I . 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 ($\text{Na-}^{131}\text{I}$). Критерием эффективности радионуклидного лечения являлось развитие гипотиреоза, требующего назначения заместительной терапии препаратами левотироксина натрия в течение 6 месяцев после проведенного лечения.

Определение гормонов проводилось в КГБУЗ «Краевая клиническая больница». Забор крови из локтевой вены обследуемых проводился натощак, после предварительного голодания в течение не менее 8 часов и не более 12 часов. Уровень ТТГ и свТ4 в сыворотке крови определялся методом хемилюминесцентного 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 свТ3 в сыворотке крови осуществлялось методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ДС-ИФА-ТИРОИД-Т3свободный» (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.

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. Субпопуляционный состав Treg, Th-клеток и цитотоксических

T-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 ($CD45R0^-CD62L^-$). 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) [Sutherland D.R. et al., 2018]. В каждой пробе анализировалось не менее 50000 лимфоцитов.

Исследование уровня продукции АФК в нейтрофилах периферической крови осуществлялось с помощью метода хемилюминесценции в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Красноярск) [Савченко А.А. и соав., 2017].

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 светозлучения только при взаимодействии с супероксид-радикалом) и люминол (реакция светозлучения при взаимодействии со всеми АФК). Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проводилось на 36-канальном биохемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Россия).

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

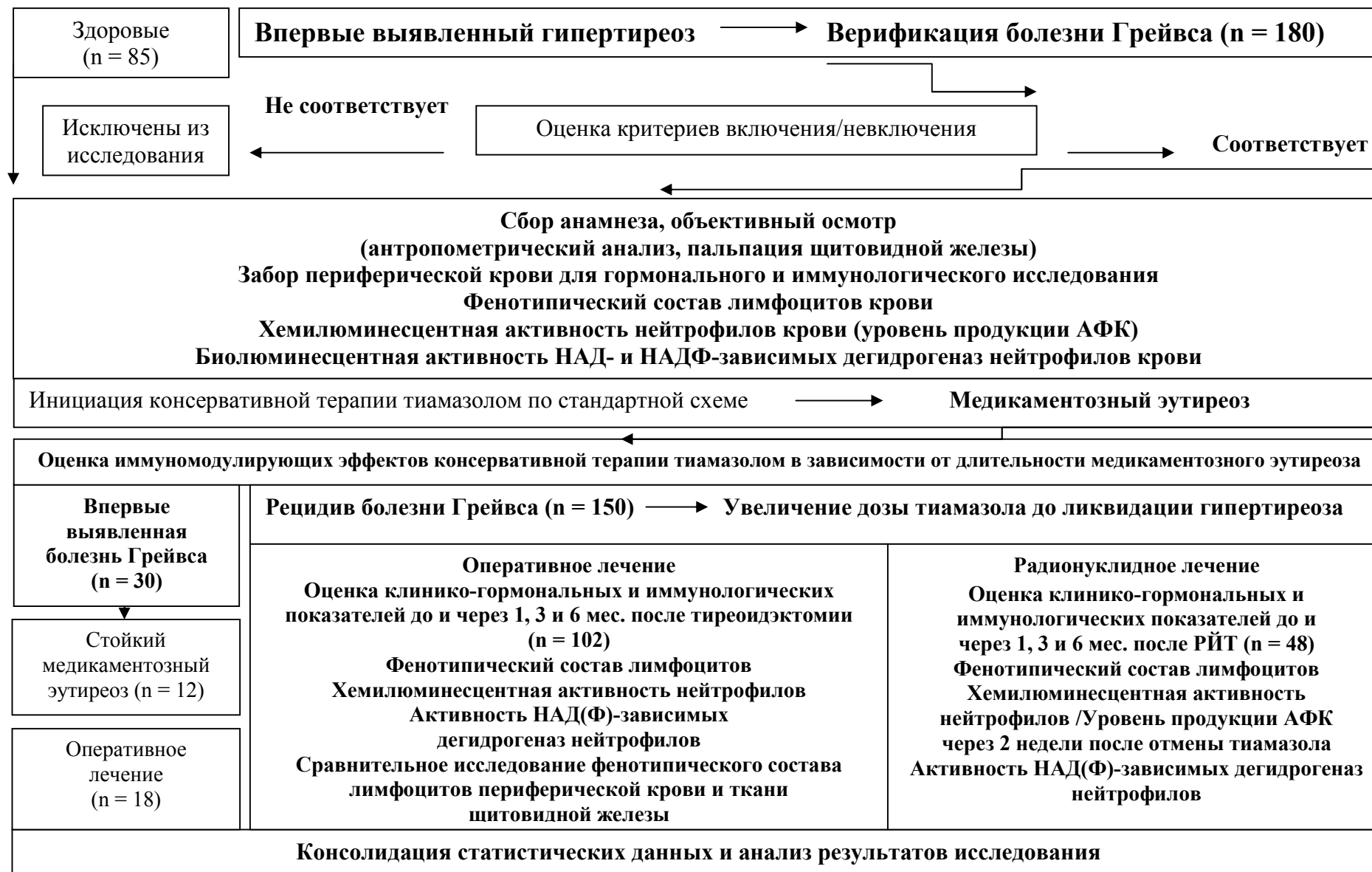


Рисунок 1 – Дизайн исследования и стратификация лечебной тактики клинических групп

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). 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 оценивалась по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Сопоставление значения признака на разных этапах динамического наблюдения проводилось с использованием непараметрического рангового дисперсионного анализа по Фридмену. При сравнении двух зависимых групп использовался критерий Вилкоксона. 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-гормональная характеристика пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса

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

При изучении клинико-гормональных и иммунологических показателей установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса с различным уровнем антител к ТПО в дебюте заболевания имеются особенности исследуемых параметров (таблица 1).

Таблица 1 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с впервые выявленной болезнью Грейвса (Me, Q₁– Q₃)

Показатели	Контроль n = 85	Пациенты с впервые выявленной болезнью Грейвса (n = 180)	
		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95	антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85
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.

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

У пациентов с болезнью Грейвса в дебюте заболевания установлены значительные отличия в фенотипическом составе лимфоцитов крови в зависимости от уровня антител к ТПО (таблица 2).

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, а также отрицательные взаимосвязи с процентным количеством Т-лимфоцитов (CD3⁺) ($r = - 0,85$, $p < 0,001$), лейко-В-клеточным коэффициентом ($r = - 0,68$, $p = 0,006$) и относительным синтезом IgM ($r = - 0,63$, $p = 0,010$).

Таблица 2 – Фенотипический состав лимфоцитов периферической крови 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		антитела к ТПО < 100 мЕд/л n = 95		антитела к ТПО > 100 мЕд/л n = 85	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
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	
CD3 ⁺ , %	73,81	68,01 – 77,82	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 ⁺ 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	
CD19 ⁺ , %	11,21	10,03 – 14,61	11,19	9,72 – 16,23	14,21	12,32 – 16,87
					p _{1,2} < 0,001	
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,24	0,22 – 0,34	0,32	0,21 – 0,39	0,39	0,31 – 0,72
					p ₁ = 0,014	

Примечание. То же, что для таблицы 1.

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.

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

Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза при консервативной терапии тиамазолом представлена в таблице 3. Таблица 3 – Клинико-гормональная характеристика пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикамент. эутиреоз 5 - 8 мес. n = 41	Медикамент. эутиреоз 9 - 12 мес. n = 69	Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25
Возраст, лет (M ± SD)	41,02 ± 12,11	43,91 ± 13,76	42,94 ± 12,24	42,43 ± 13,09
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
Антитела к рТТГ, 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

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

Установлено, что фенотипический состав Т-лимфоцитов крови у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии тиамазолом изменяется в зависимости от длительности медикаментозного эутиреоза (таблица 4).

Таблица 4 – Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при разной длительности медикаментозного эутиреоза (Me, Q₁ – Q₃)

Показатели	Контроль n = 85	Пациенты с болезнью Грейвса		
		Медикмент. эутиреоз 5 - 8 мес. n = 41	Медикамент. эутиреоз 9 - 12 мес. n = 69	Медикамент. эутиреоз > 12 мес. n = 25
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 ⁺ 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)
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. То же, что для таблицы 3.

Разработан способ прогнозирования развития рецидива при планировании длительного консервативного лечения в дебюте болезни Грейвса с помощью коэффициента В1-клеточной активации (В1КА), – соотношение процентного содержания активированных В1-лимфоцитов к процентному содержанию Т-лимфоцитов, В1КА = активированные В1-лимфоциты/Т-лимфоциты (таблица 5, рисунок 2).

Таблица 5. ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза рецидива болезни Грейвса при консервативном лечении

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

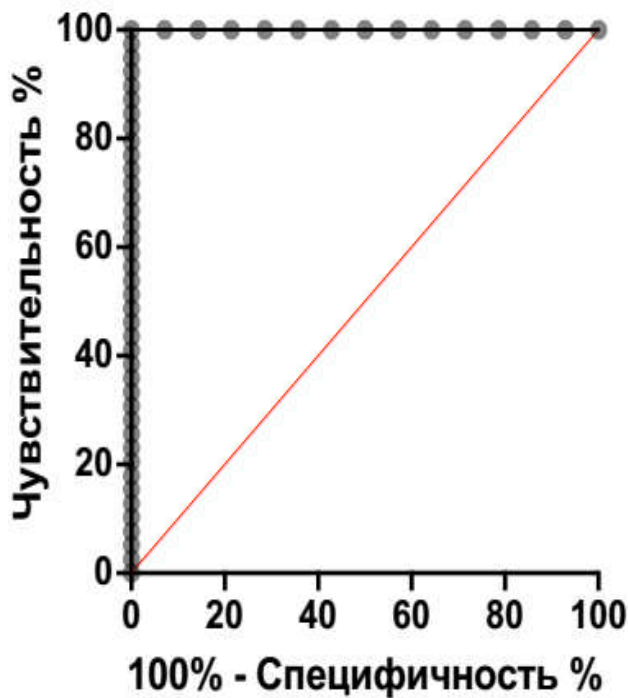


Рисунок 2 – ROC-кривая значения коэффициента В1КА и исхода консервативного лечения

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 коэффициента В1КА и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием пациентов с болезнью Грейвса. 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 развивается рецидив заболевания, – 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.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив)

Наиболее выраженные изменения установлены у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом в активности Г6ФДГ, шунтирующей реакции НАДФ-МДГ (рисунок 3 а, б), а также ЛДГ и НАДН-ГДГ нейтрофилов (рисунок 3 в, г).

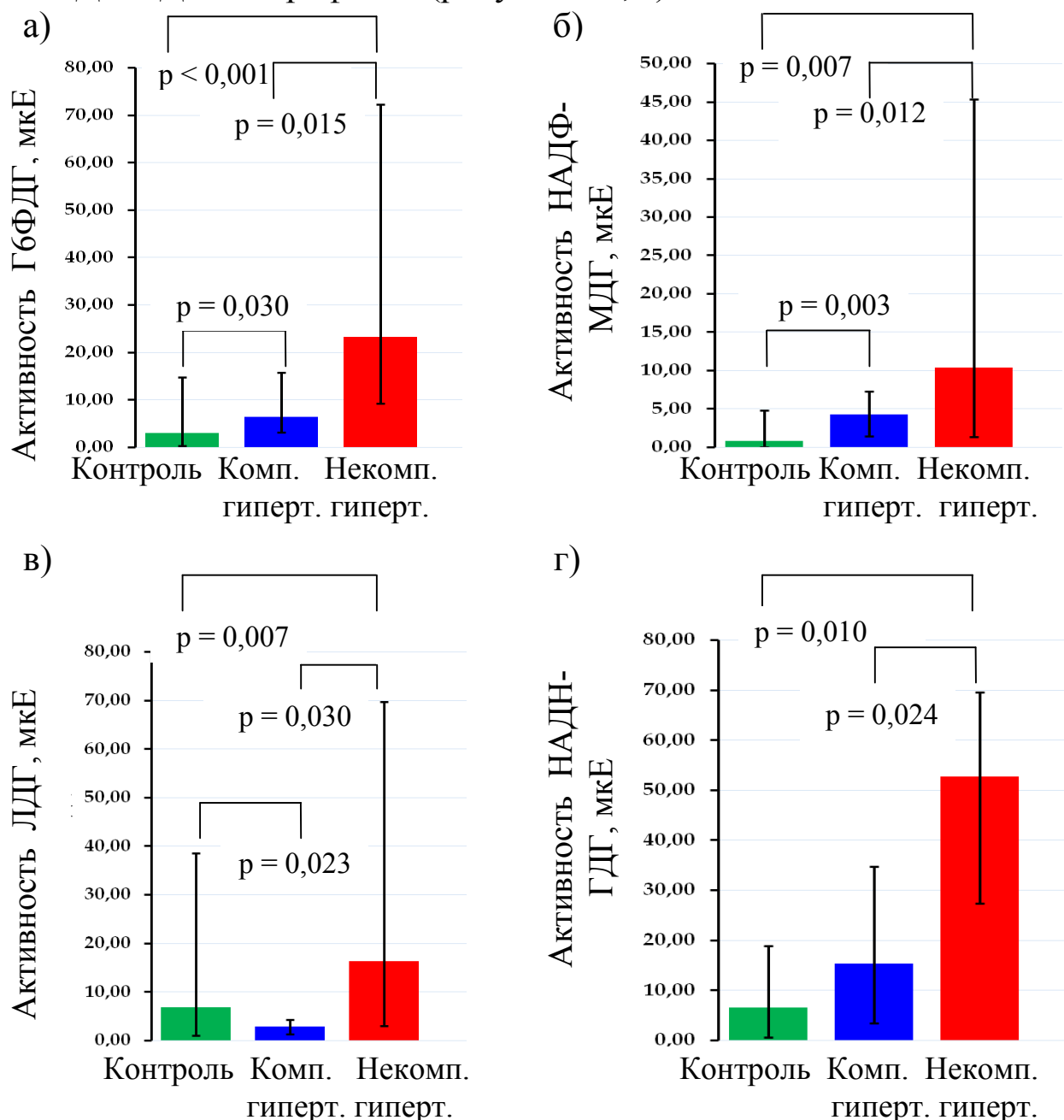


Рисунок 3 – Активность НАДФ- и НАД(Н)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса с компенсированным и некомпенсированным гипертиреозом

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

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии в крови снижено абсолютное и процентное количество Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}), соответственно, – Me = 0,014% (0,009–0,02), у лиц контрольной группы – Me = 0,06% (0,05–0,12), p<0,001 и Me = 0,87% (0,62–1,25), у лиц контрольной группы – Me = 1,55% (0,83–3,09), p<0,001. Выявлено, что через 6 месяцев после тиреоидэктомии в периферической крови пациентов с болезнью Грейвса снижен процентный уровень наивных (CD45R0⁻CD62L⁺) Treg – Me = 0,005% (0,003–0,008), у лиц контрольной группы – Me = 0,36% (0,26–0,69), p<0,001 и терминально-дифференцированных (CD45R0⁻CD62L⁺) Treg – Me = 0,004% (0,002–0,010), у лиц контрольной группы – Me = 0,14% (0,12–0,21), p<0,001. Через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса снижено процентное число Th-клеток эффекторной памяти (CD45R0⁺CD62L⁻) – Me = 5,71% (5,19–9,65), у лиц контрольной группы – Me = 10,02% (8,52–13,42), p<0,001, но при повышении терминально-дифференцированных Th-клеток (CD45R0⁻CD62L⁻) – Me = 6,77% (3,46–10,82), у лиц контрольной группы – Me = 1,05% (0,64–1,77), p=0,010.

Через 6 месяцев после тиреоидэктомии у пациентов с болезнью Грейвса установлено снижение процентного уровня В-клеток памяти, как экспрессирующих (CD19⁺CD27⁺CD23⁺), так и не экспрессирующих маркер CD23 (CD19⁺CD27⁺), соответственно, Me = 0,009% (0,003–0,21), у лиц контрольной группы – Me = 0,40% (0,20–0,92), p<0,001 и Me = 2,01% (1,45–5,75), у лиц контрольной группы – Me = 3,21% (2,13–4,42), p=0,020. Установлено, что через 6 месяцев после оперативного лечения у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижено процентное число В1-клеток (CD19⁺CD5⁺) – Me = 1,22% (0,75–2,11), у лиц контрольной группы – Me = 1,77% (1,22–2,61), p=0,020, активированных В-лимфоцитов (CD19⁺CD23⁺) – Me = 0,06% (0,03–0,15), у лиц контрольной группы – Me = 1,51% (0,62–6,13), p<0,001, В1-клеток (CD19⁺CD5⁺CD23⁺) – Me = 0,03% (0,02–0,11), у лиц контрольной группы – Me = 0,24% (0,08–0,62),

$p < 0,001$, В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) – $Me = 0,05\%$ (0,03–0,36), у лиц контрольной группы – $Me = 0,24\%$ (0,14–4,44), $p < 0,001$.

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

Содержание Th-клеток и Treg в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлено в таблице 6. Таблица 6 – Содержание Th- и T-регуляторных клеток в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса (Me, Q_1-Q_3)

Показатели	Контроль n = 85		Пациенты с болезнью Грейвса n = 75			
			В крови		В ткани	
	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	1,01	0,12 – 3,01
				$p_1=0,021$		

Примечание. p_1 – статистически значимые различия с контрольными показателями; p_2 – -//- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлен в таблице 7. 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 ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), $r = 0,54$, $p = 0,010$, а процентное число 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 $r = 0,52$, $p = 0,011$.

Таблица 7 – 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	
	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 – 21,31
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
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

Примечание. То же, что для таблицы 6.

Процентное содержание активированных В-клеток в крови и ткани щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса представлено в таблице 8. У пациентов с болезнью Грейвса процентное количество Th-клеток (CD3⁺CD4⁺) в ткани щитовидной железы 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⁺), $r = 0,85$, $p = 0,021$. У пациентов с болезнью Грейвса корреляции уровня Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}) с отдельными субпопуляциями Th-клеток и В-лимфоцитов не выявлены.

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.

Таблица 8 – Количество активированных В-клеток в крови и ткани щитовидной железы (в %) у пациентов с болезнью Грейвса

(Me, $Q_1 - Q_3$)

Показатели	Контроль		Пациенты с болезнью Грейвса n = 75			
	n = 85		В крови		В ткани	
	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. То же, что для таблицы 6.

У пациентов с болезнью Грейвса 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.

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

Установлено, что через 6 месяцев после радиойодтерапии (РЙТ) в крови пациентов с болезнью Грейвса снижено абсолютное и про-

центное количество Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), соответственно, – Me = 0,010% (0,007–0,04), у лиц контрольной группы – Me = 0,06% (0,05–0,11), $p < 0,001$ и Me = 1,01% (0,77–2,04), у лиц контрольной группы – Me = 1,55% (0,83–3,09), $p = 0,003$. При изучении отдельных субпопуляций Treg установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после РЙТ снижен процентный уровень наивных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg – Me = 0,001% (0,0006–0,016), у лиц контрольной группы – Me = 0,36% (0,26–0,69), $p < 0,001$ и терминально-дифференцированных ($CD45R0^-CD62L^+$) Treg – Me = 0,001% (0,0007–0,003), у лиц контрольной группы – Me = 0,14% (0,12–0,21), $p < 0,001$. Причем, 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 ($\chi^2 = 8,62$, $p = 0,035$). Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса выявлено снижение процентного уровня Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) – Me = 0,15% (0,12–0,32), у лиц контрольной группы – Me = 0,41% (0,21–0,55), $p = 0,010$. Установлено, что уровень Treg эффекторной памяти ($CD45R0^+CD62L^-$) у пациентов с болезнью Грейвса снижается последовательно в динамике после радионуклидного лечения ($\chi^2 = 10,93$, $p = 0,012$). Через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса повышено процентное число Th-клеток центральной памяти ($CD45R0^+CD62L^+$) – Me = 14,78% (12,25–17,26), у лиц контрольной группы – Me = 12,25% (10,80–14,49), $p = 0,012$.

Установлено, что у пациентов с болезнью Грейвса уже через 1 месяц после радионуклидного лечения количество активированных В-клеток ($CD19^+CD23^+$) в крови статистически значимо снижается как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявляемых до радионуклидного лечения ($\chi^2 = 8,10$, $p = 0,042$). Выявлено, 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 пациентов с болезнью Грейвса

выявлено снижение процентного уровня В-клеток памяти, как экспрессирующих ($CD19^+CD27^+CD23^+$), так и не экспрессирующих маркер CD23 ($CD19^+CD27^+$), соответственно, $Me = 0,04\%$ (0,01–0,17), у лиц контрольной группы – $Me = 0,40\%$ (0,20–0,92), $p < 0,001$ и $Me = 1,83\%$ (1,71–2,29), у лиц контрольной группы – $Me = 3,21\%$ (2,13–4,42), $p < 0,001$. Установлено, что через 6 месяцев после радионуклидного лечения у пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо снижено процентное число активированных В-лимфоцитов ($CD19^+CD23^+$) – $Me = 0,06\%$ (0,02–0,32), у лиц контрольной группы – $Me = 1,51\%$ (0,62–6,13), $p < 0,001$, В1-клеток ($CD19^+CD5^+CD23^+$) – $Me = 0,03\%$ (0,01–0,13), у лиц контрольной группы – $Me = 0,24\%$ (0,08–0,62), $p < 0,001$, В2-клеток ($CD19^+CD5^-CD23^+$) – $Me = 0,03\%$ (0,02–0,11), у лиц контрольной группы – $Me = 0,24\%$ (0,14–4,44), $p < 0,001$ и наивных активированных В-клеток ($CD19^+CD27^-CD23^+$) – $Me = 0,02\%$ (0,01–0,07), у лиц контрольной группы – $Me = 0,49\%$ (0,09–7,76), $p = 0,024$.

У пациентов с болезнью Грейвса, до радионуклидного лечения, установлена положительная взаимосвязь процентного количества терминально-дифференцированных Treg ($CD45R0^-CD62L^-$) с концентрацией свТЗ ($r = 0,64$, $p = 0,025$), а также процентного числа Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$) 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 наивных $CD45R0^-CD62L^+$ Treg ($r = 0,67$, $p = 0,045$) и $CD45R0^-CD62L^-$ Treg ($r = 0,68$, $p = 0,046$). 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 ($r = 0,72$, $p = 0,030$).

Разработан способ раннего прогнозирования эффективности радионуклидного лечения болезни Грейвса, 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 9, рисунок 4).

Таблица 9 – ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза эффективности радионуклидного лечения при болезни Грейвса

Коэффициент	AUC	Оптим. знач.	Чувствит., %	Специф., %	p
$CD3^+CD4^+CD25^+$ / $CD19^+$	1	0,104	100	100	0,0001

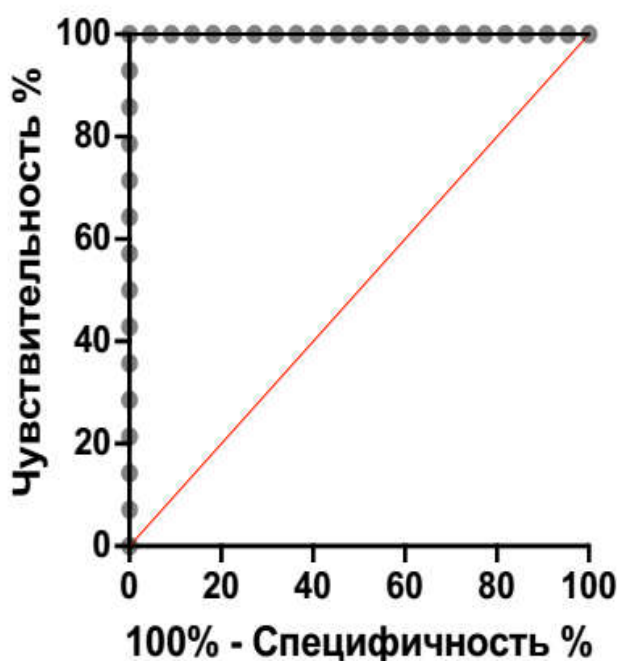


Рисунок 4 – ROC-кривая значения коэффициента ТХР и исхода радионуклидного лечения

При значении ТХР ниже 0,105 прогнозируют развитие стойкого пострадиационного гипотиреоза через 6 месяцев после РЙТ, значение ТХР равное и выше 0,105 прогнозируют отсутствие 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 РЙТ.

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 РЙТ будет достигнут стойкий пострадиационный гипотиреоз, - величина коэффициента ТХР была ниже 0,105. У 4 (16,00%) больных было спрогнозировано отсутствие стойкого снижения функции щитовидной железы в исходе РЙТ, величина коэффициента ТХР у них была равной и выше 0,105. По результатам дальнейшего клинического наблюдения установлено совпадение прогноза в 100% случаев.

Уровень продукции АФК в нейтрофилах периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола перед радионуклидным лечением

У пациентов с болезнью Грейвса независимо от тиреоидной функции в исходе двухнедельной отмены тиамазола установлены выраженные изменения в продукции первичных (таблица 10) и вторичных АФК нейтрофилов (таблица 11).

Таблица 10 – Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через две недели после отмены тиамазола перед РЙТ (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Медикамент. эутиреоз n = 16	Изолиров. ТЗ–тиреоток. n = 17	Манифест. гипертир. n = 15
Спонтанная хемилюминесценция				
Т _{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				
Т _{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.

Таблица 11 – Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса через две недели после отмены тиамазола перед РЙТ (Me, Q₁– Q₃)

Показатель	Контроль n = 85	Медикамент. эутиреоз n = 16	Изолиров. ТЗ– тиреоток. n = 17	Манифест. гипертир. 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. То же, что для таблицы 10.

У пациентов с болезнью Грейвса в исходе двухнедельной отмены тиамазола перед РЙТ, независимо от тиреоидной функции, установлены положительные связи уровня антител к рТТГ и S ($r = 0,32$; $p = 0,034$), а также содержания свТЗ и I_{max} ($r = 0,34$; $p = 0,032$) люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов.

СПОСОБ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ВЫБОРУ МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ В ДЕБЮТЕ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

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 12, рисунок 5).

Таблица 12 – ROC-характеристики расчетного коэффициента для прогноза эффективности консервативного, оперативного и радионуклидного лечения в дебюте болезни Грейвса

Коэффициент	AUC	Оптим. знач.	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

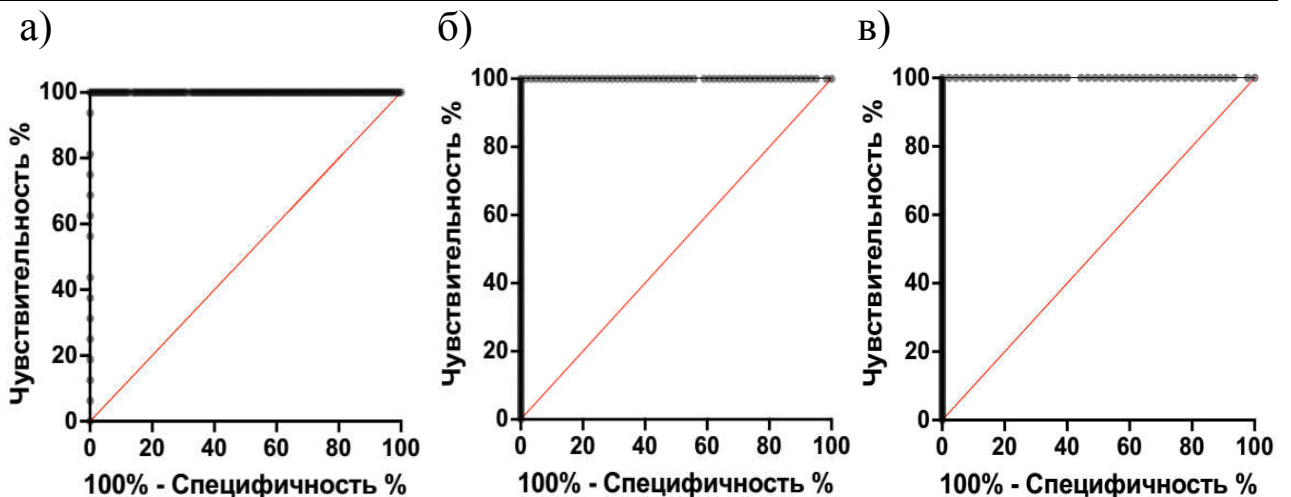


Рисунок 5 – ROC-кривая значения коэффициента ВКР и исхода консервативного, оперативного и радионуклидного лечения болезни Грейвса. а – консервативное лечение тиамазолом; б – оперативное лечение; в – радионуклидное лечение

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. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В свете новых полученных данных генетически детерминированное состояние иммунологической толерантности у пациентов с болезнью Грейвса через 6 месяцев после тиреоидэктомии и РЙТ 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 (рисунок 6).

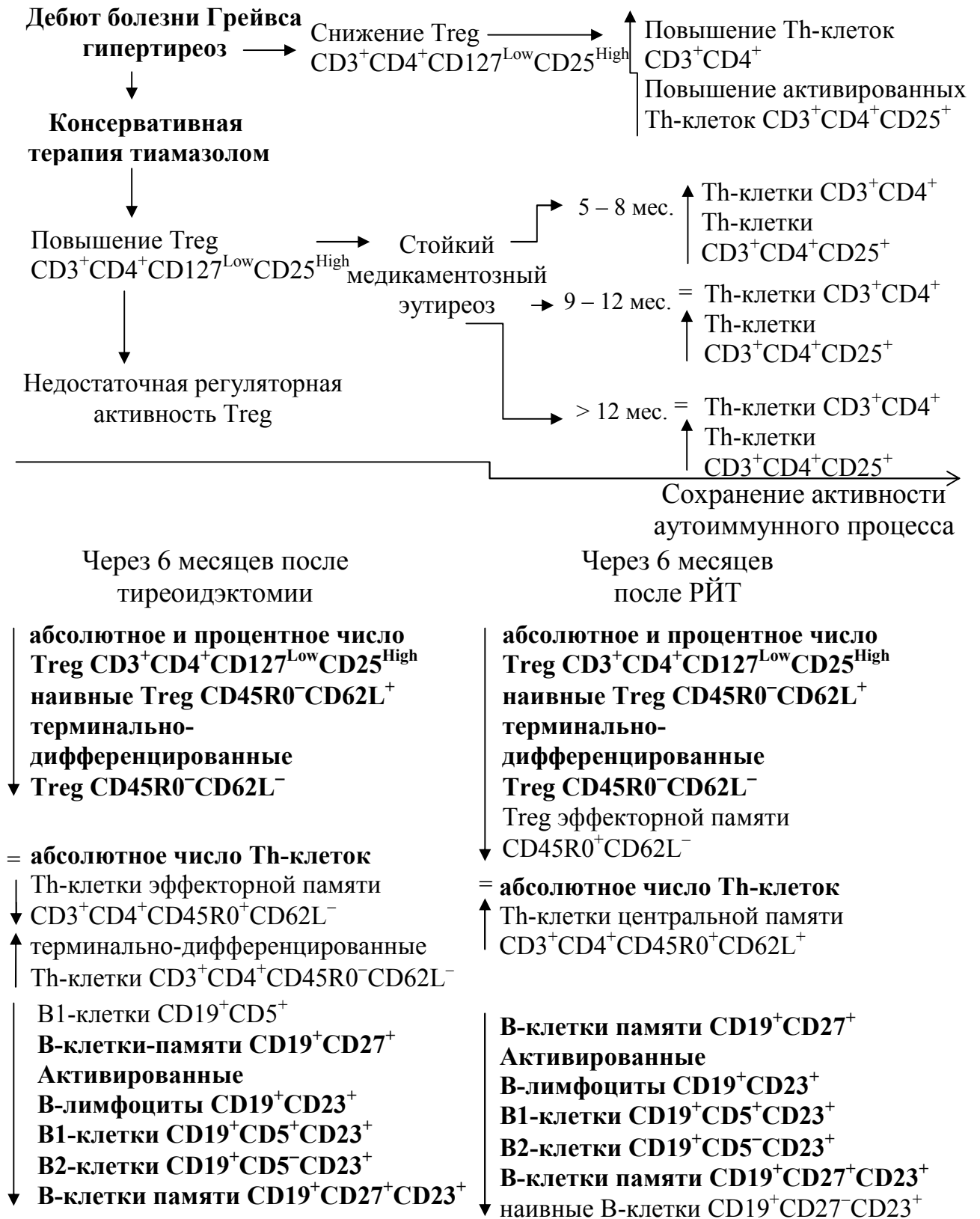


Рисунок 6 – Схема изменений количества Treg, Th- и V-клеток крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от метода лечения. Стрелками указаны изменения относительно контрольных значений; « = » – соответствие контрольному диапазону; жирным текстом выделены сходные изменения после оперативного и радионуклидного лечения.

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 параметрами 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} зимозан-индуцированной люминол-зависимой 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 эутиреоза 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 щитовидной 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 персонализированного 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 клинко-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 пострадиационного 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 медика-

ментозное лечение и при значении ВКР равном и выше 1,33 – хирургическое.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Дудина М.А. Клинико-иммунологические показатели и их взаимосвязь с тиреоидным статусом у больных болезнью Грейвса в зависимости от уровня аутоантител к тиреопероксидазе / А.А. Савченко, С.А. Догадин, М.А. Дудина, В.П. Мацынина // Проблемы эндокринологии. – 2016. – 62. – №1. – С.4-9; 6/1.50 с. ИФ – 0,495.**
- 2. Дудина М.А. Активность респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов крови в дебюте болезни Грейвса / С.А. Догадин, М.А. Дудина, А.А. Савченко, И.И. Гвоздев, В.А. Маньковский // Проблемы эндокринологии. – 2017. – Т. 63. – №1. – С. 4-8; 5/1.00 с. ИФ – 0,573.**
- 3. Дудина М.А. Влияние хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и щитовидной железы при болезни Грейвса / А.А. Савченко, М.А. Дудина, А.Г. Борисов, С.А. Догадин, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев, В.А. Маньковский // Медицинская иммунология. – 2018. – Т.20. – №3. – С. 431-438; 8/1.14 с. ИФ – 0,563.**
- 4. Дудина М.А. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови при болезни Грейвса / М.А. Дудина, А.А. Савченко, С.А. Догадин, И.И. Гвоздев // Проблемы эндокринологии. – 2020. – Т.66. – №2. – С. 33-41; 9/2.25 с. ИФ – 0,852.**
- 5. Дудина М.А. Состояние иммунитета при болезни Грейвса / Д.В. Фомина, М.А. Дудина, С.А. Догадин // Забайкальский медицинский вестник.– 2020. – №3. – С. 131-140; 10/3.33 с. ИФ – 0,345.**
- 6. Дудина М.А. Морфологические особенности фолликулов щитовидной железы и состав интратиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса / М.А. Дудина, А.А. Савченко, Н.Н. Медведева, Г.К. Ковалева, Е.Л. Жуков, В.А. Маньковский, С.А. Догадин // Морфологические ведомости. – 2021. – Т. 29. – №2. – С. 556-559; 4/0.44 с. ИФ – 0,444.**
- 7. Дудина М.А. Фенотипический состав Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии тиамазолом / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А.**

Савченко, В.Д. Беленюк // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т.67. – №7. – С.11-21; 11/2.75 с. ИФ – 0,951.

8. Dudina M.A. Impaired immune response of T-regulatory cells in peripheral blood and thyroid tissue after long-term thiamazole treatment for Graves disease / M.A. Dudina, S.A. Dogadin, A.A. Savchenko, V.A. Mankovsky // *Thyroid*. – 2021. – Vol. 31. – №1. – P. 190; 2/0.4 с. ИФ – 6,568.

9. Dudina M.A. The Level of NAD(P)-dependent dehydrogenases in blood lymphocytes in patients with manifesting and relapsing Graves hyperthyroidism / M.A. Dudina, S.A. Dogadin, A.A. Savchenko, I.I. Gvozdev // *Thyroid*. – 2021. – Vol. – 31. – №1. – P. 244; 1/0.2 с. ИФ – 6,568.

10. Дудина М.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, И.И. Гвоздев // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2022. – Т. 18. – №1. – С. 4-14; 11/2.75 с. ИФ – 0,857.

11. Дудина М.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса в исходе 2-недельной отмены тиамазола / М.А. Дудина, Д.В. Фомина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, И.И. Гвоздев // *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. – 2022. – Т.11. – №3. – С. 7-14; 8/1.60 с. ИФ – 0,410.

12. Дудина М.А. Уровень оксидативного стресса и энзиматическая активность нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, И.И. Гвоздев // *Атеросклероз*. – 2022. – Т. 18. – №4. – С. 411-414; 4/1.00 с. ИФ – 0,353.

13. Дудина М.А. Changes in the T and B lymphocyte subset profiles upon treatment of patients with Graves' disease with radioactive iodine / А.А. Савченко, М.А Дудина., С.А. Догадин, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, Д.В. Фомина, В.Д. Беленюк // *Медицинская иммунология = Medical Immunology (Russia) = Meditsinskaya immunologiya*. – 2022. – Т. 24. – №5. – С. 1007-1016; 10/1,40 с. ИФ – 0,718.

14. Савченко А.А. Способ прогнозирования рецидива при медикаментозном лечении болезни Грейвса / А.А. Савченко, М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.Г. Борисов, В.Д. Беленюк // Патент на изобретение № 2778614, приоритет изобретения 01 декабря 2021 г.,

зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 22 августа 2022 г.;8/1.60 с.

15. Дудина М.А. Уровень регуляторных Т-лимфоцитов и В-клеток у пациентов с болезнью Грейвса после тиреоидэктомии / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, В.Д. Беленюк, В.А. Маньковский, А.Г. Борисов // Доктор. Ру. – 2023. – Т.22. – №4. – С.65-71; 7/1.10 с. ИФ – 0,661.

16. Дудина М.А. Особенности субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток крови и уровень экспрессии CD25 у пациентов с болезнью Грейвса в динамике после радионуклидного лечения / М.А. Дудина, А.А. Савченко, С.А. Догадин, А.Г. Борисов, В.Д. Беленюк // Проблемы Эндокринологии. – 2023. – Т.69. – №3. – С.11-19; 9/1.80 с. ИФ – 0,951.

17. Дудина М.А. Способ прогнозирования радиойодтерапии болезни Грейвса / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, Д.В., Фомина, В.Д. Беленюк // Патент на изобретение № 2791390, приоритет изобретения 15 апреля 2022 г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 07 марта 2023 г.;7/1.40 с.

18. Дудина М.А. Способ персонифицированного подхода к выбору метода лечения болезни Грейвса / М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, В.Д. Беленюк // Патент на изобретение № 2794815, приоритет изобретения 26 августа 2022 г., зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 25 апреля 2023 г.;11/2.75 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
ТХР	– коэффициент Т-хелперной регуляции
В1КА	– коэффициент В1-клеточной активации
ВКР	– коэффициент В-клеточной регуляции
Imax	– максимальный уровень синтеза АФК
S	– суммарный синтез АФК за 90 минут измерения
Синд./	– соотношение суммарного синтеза АФК за 90
Спонт.	минут измерения
Tmax	– скорость развития хемилюминесцентной реакции
Treg	– регуляторные Т-клетки