

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭНДОКРИНОЛОГИИ ИМЕНИ  
АКАДЕМИКА И.И. ДЕДОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

КАЗАКОВА Мария Петровна

РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АУТОРЕАКТИВНЫХ КЛЕТОК И АНТИТЕЛ В ПАТОГЕНЕЗЕ  
СОЧЕТАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

3.1.19. – ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Трошина Екатерина Анатольевна

МОСКВА  
2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ .....	9
ЭТИОЛОГИЯ .....	13
ГЕНЕТИКА.....	20
ПАТОГЕНЕЗ АИТ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК И АНТИТЕЛ.....	20
ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ АИТ .....	24
КОМОРБИДНОСТЬ ЙОДОДЕФИЦИТНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И АИТ .....	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ .....	28
2.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ .....	32
2.3. Оценка количества Т- и В- лимфоцитов, в т.ч. ТГ-, ТПО-специфических В-лимфоцитов в ткани ЩЖ и крови пациентов .....	40
2.4. Источник финансирования .....	49
2.5. Этическая экспертиза .....	49
2.6. Статистическая обработка данных.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	50
3.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ .....	50
3.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ .....	65
3.3. Оценка количества Т и В- лимфоцитов, в т.ч. антигенспецифичных В- лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ .....	86
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЯ.....	96
4.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных АИТ .....	96
4.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ .....	99
4.3 Оценка количества Т и В- лимфоцитов, в т.ч. антигенспецифичных В- лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ .....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ .....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	112
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	119
Приложение 1. Анкета участника .....	119

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Последнее десятилетие характеризуется ежегодным увеличением заболеваемости аутоиммунными патологиями, что подчеркивает актуальность исследований, направленных на выявление факторов, влияющих на развитие и прогрессирование этих нарушений, а также изучение основных патогенетических механизмов с целью разработки эффективных профилактических мероприятий.

Большинство аутоиммунных заболеваний, таких как сахарный диабет (СД) 1 типа и первичная надпочечниковая недостаточность, характеризуются яркими начальными клиническими проявлениями, что способствует своевременному обращению пациентов за медицинской помощью и позволяет вести точный учет распространённости этих нозологических форм. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ), зачастую, является лабораторным диагнозом из-за отсутствия выраженных клинических симптомов. Широкая доступность лабораторных методов исследований приводит к высокой выявляемости повышенного уровня антител (АТ) к тиреопероксидазе (ТПО). Однако, в соответствии с клиническими рекомендациями и диагностическими критериями, диагноз АИТ чаще всего устанавливается при наличии гипотиреоза, что делает оценку истинной картины "антителоносительства" затруднительной без проведения дополнительных эпидемиологических исследований.

В форме федерального статистического наблюдения № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в районе обслуживания медицинской организации», АИТ объединен в группу тиреоидитов вместе с гнойным тиреоидитом, тиреоидитом де Кервена, Риделя, медикаментозным и другими хроническими формами. Это также не позволяет в полной мере оценить распространенность данной патологии.

Отсутствие прогностических маркеров гипотиреоза не позволяет достоверно оценить вероятность его развития у «носителей» АТ к ТПО. Длительное наблюдение у врача и периодическая оценка уровня тиреотропного гормона (ТТГ) требуют значительных временных и материальных затрат от пациента, что снижает качество его жизни. Основой для поиска прогностических маркеров является изучение патогенеза заболевания, в основе которого лежит многокомпонентный механизм взаимодействия клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Различия в клеточном составе крови у пациентов с АИТ и здоровых лиц, а также определенные функциональные роли некоторых клеток, указывают на возможность рассмотрения звеньев клеточного иммунитета в качестве потенциальных прогностических маркеров гипотиреоза.

Официальная статистика заболеваемости свидетельствует о высокой распространенности заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) среди всех эндокринных патологий. Одной из причин роста заболеваемости является сохраняющаяся проблема йододефицита в Российской Федерации, что вызывает интерес к его влиянию на развитие и течение АИТ. Коморбидность данных состояний очевидна, при этом многие фундаментальные механизмы их патогенетических взаимовлияний нуждаются в изучении. Особенно актуальным считается вопрос о том, что именно запускает процесс нарушения аутоотолерантности, и определяет выраженность и направленность поражения.

Изучение прогностической роли аутореактивных и иммунокомпетентных клеток при сочетанных заболеваниях ЩЖ позволит выявить возможные ассоциации в их патогенезе. А определение последовательности антигенных детерминант аутоантител, позволит использовать полученные данные для поиска новых подходов к профилактике и терапии аутоиммунных тиреопатий на ранних этапах, позволяющих предотвратить манифестацию и прогрессирование аутопатологии.

### **Цель исследования**

Оценить роль аутореактивных и иммунокомпетентных клеток в патогенезе сочетанных заболеваний щитовидной железы, на примере хронического аутоиммунного тиреоидита и узлового зоба и изучить клеточный репертуар у лиц-носителей антител к тиреопероксидазе (бессимптомное носительство или аутоиммунный тиреоидит), проживающих в условиях дефицита йода.

### **Задачи исследования**

1. Оценить распространённость «носительства» антител к тиреопероксидазе у условно здоровых людей, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита.
2. Оценить распространённость сочетания (много) узлового зоба и хронического аутоиммунного тиреоидита у лиц, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита.
3. Изучить взаимосвязь «носительства» антител к тиреопероксидазе с потенциальными факторами, инициирующими развитие аутоиммунных заболеваний ЩЖ.
4. Изучить соотношения и функциональную активность Т- и В-регуляторных клеточных звеньев иммунитета у здоровых лиц, бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе аутоиммунного тиреоидита.
5. Определить содержание Th-1, Th-2 и Th-17 *in vitro* и степень индукции под действием неспецифических активаторов у условно здоровых лиц, «носителей»

аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе аутоиммунного тиреоидита.

6. Определить содержание IL-10 продуцирующих Т- и В- лимфоцитов *in vitro* и степень индукции под действием неспецифических активаторов у условно здоровых лиц, «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе аутоиммунного тиреоидита.
7. Изучить содержание аутореактивных клеток в крови и ткани щитовидной железы у лиц с повышенным уровнем антител к тиреопероксидазе и/или антител к тиреоглобулину и (много) узловым зобом и у лиц с (много) узловым зобом без носительства антитиреоидных антител.

### **Научная новизна исследования**

Впервые в Тульской области и Чеченской Республике, в регионах с подтвержденным легким йодным дефицитом, проведена комплексная оценка связи между частотой встречаемости АИТ и йодным статусом.

Количество фундаментальных исследований, посвященные изучению патогенетических механизмов при АИТ, в которых целевыми группами являются «носители» АТ к ТПО без нарушенной функции ЩЖ и пациенты с гипотиреозом (как изолированным, так и в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома (АПС)), невелико. Выявленные различия между данными целевыми группами могут служить основой для разработки эффективных мер профилактики прогрессирования АИТ. Одним из участников патогенеза являются В-регуляторные лимфоциты, информация о которых представлена в единичных общемировых исследованиях. Впервые в Российской Федерации проведено исследование регуляторных В- лимфоцитов у пациентов с АИТ.

Впервые в мире отработана методика определения аутореактивных В- лимфоцитов в ткани ЩЖ (установлены типы антигенов, подходящие для детекции; подобраны условия окрашивания) и определено содержание данных клеток у пациентов с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ и условно здоровых лиц. Дальнейшее изучение фенотипа аутореактивных клеток и структуры соответствующих им антител позволят оценить их прогностическую способность развития и/или прогрессирования АИТ, для создания новых диагностических алгоритмов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Оценка распространенности АИТ и изучение факторов риска прогрессирования гипотиреоза в исходе АИТ позволят разработать более эффективные программы скрининга в группах высокого риска и разработать меры профилактики, направленные на снижение заболеваемости.

2. Результаты исследования патогенетических механизмов АИТ могут послужить основой для открытия ключевых молекулярных мишеней, которые могут быть использованы для разработки новых диагностических и терапевтических методов.
3. Определение методики детекции аутореактивных В-клеток в ткани ЩЖ позволит провести дальнейшие исследования структуры соответствующих им антител и сформировать новые молекулярные диагностические алгоритмы развития и/или прогрессирования АИТ.

#### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Казакова М.П. провела всесторонний анализ текущего состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных и сформулировала цель, задачи и дизайн диссертационной работы. Она активно участвовала в клинической работе с пациентами, организовывала проведение лабораторных исследований.

Казакова М.П. участвовала в выездных мероприятиях в Тульскую область и Чеченскую Республику, где осуществляла сбор анамнестических данных и биологического материала. Она освоила методики выделения моноклеарных клеток из крови пациентов и аутореактивных клеток из крови и ткани ЩЖ, активно участвовала в экспериментах по подбору методов окрашивания антигенспецифичных клеток и самостоятельно осуществила набор образцов. Основной объем работы по сбору клинико-анамнестических данных, подготовке базы пациентов, статистической обработке данных и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций и докладов по теме работы выполнены лично автором.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В условиях йодного дефицита наблюдается повышенная распространенность АИТ. Для снижения частоты сочетанных йододефицитных и аутоиммунных патологий ЩЖ целесообразно проведение йодной профилактики;
2. Снижение IL10 - продуцирующих В - регуляторных лимфоцитов рекомендовано рассматривать, как предиктор развития аутоиммунного процесса в ЩЖ;
3. Комплексы биотинилированных рекомбинантных ТГ и ТПО, синтезированных в эукариотической системе экспрессии с флуоресцентно-мечеными конъюгатами стрептавидина: TG-bio16 и стрептавидина (PE/Cy5) в соотношении 1:1 и комплекс ТРО-bio4 и стрептавидина (PE/Cy5) в молярных соотношениях 1:1 подходят для максимально эффективной детекции ТГ и ТПО специфичных В- лимфоцитов.

#### **Степень достоверности и апробация полученных результатов**

Достоверность изложенных в настоящем исследовании положений, выводов и рекомендаций подтверждается тщательным анализом научно-исследовательских работ по

изучению АИТ; согласованностью полученных результатов с зарубежными данными; применением методов исследования с доказанной эффективностью; проведением экспериментальных методов согласно стандартам и с современными средствами измерений; применением статистического анализа для обработки полученных данных.

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 27.08.2024г. на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ.

Результаты работы представлены на ежегодном конгрессе X (XXIX) Национальном конгрессе эндокринологов с международным участием «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение» (НКЭ 2023) (Москва, Россия, 2023 г.), на ежегодном конгрессе ESE 2023 Европейского общества эндокринологов (Стамбул, Турция, 2023 г.), на ежегодном конгрессе V (XXX) Национальном конгрессе эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии» (ИТЭ 2024) (Москва, Россия, 2024 г.), на ежегодном конгрессе ESE 2024 Европейского общества эндокринологов (Стокгольм, Швеция, 2024 г.), на ежегодном конгрессе Европейской тиреоидной ассоциации (Афины, Греция, 2024г. )

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе: 1 полнотекстовая рукопись в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, тезисы в сборниках российских конференций, зарубежные тезисы, сформированы и запатентованы 2 базы данных: «Результаты антропометрического, гормонального и иммунологического обследований населения Чеченской Республики, как йододефицитного региона» № 2023624082 от 21.11.2023; «Результаты антропометрического, гормонального, иммунологического и инструментального обследований населения Тульской области, как йододефицитного региона» № 2023624104 от 22.11.2023.

1. Казакова М.П., Трошина Е., Дьяков И., Першина-Милютин А., Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Бушкова К.К. Носительство антител к тиреоидной пероксидазе: распространенность и оценка иммунологических показателей в рамках поиска новых прогностических маркеров гипотиреоза. Российский медицинский журнал. 2024; 30(6): 590-603. <https://doi.org/10.17816/medjrf641704>
2. Казакова М.П., Цкаева А.А., Старостина Е.А., Трошина Е.А. Аутоиммунный тиреоидит — что нового? Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2023;19(4):4-12. <https://doi.org/10.14341/ket12781>

3. Казакова М.П., Трошина Е.А. Дайджест с 46-й ежегодной встречи Европейской Тиреоидологической Ассоциации. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2024;20(3):29-32. <https://doi.org/10.14341/ket12804>
4. Трошина Е.А., Маколина Н.П., Платонова Н.М., Исаева М.П., Иванова А.А., Никанкина Л.В., Галиева М.О., Елфимова А.Р., Прилепа С.А., Дайльнев В.И. Дефицит йода и распространенность йододефицитных заболеваний в Тульской области: современное состояние и пути решения проблемы. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2024;20(2):15-26. <https://doi.org/10.14341/ket12801>
5. Трошина Е.А., Маколина Н.П., Колпакова Е.А., Никифорович П.А., Исаева М.П., Абдулхабирова Ф.М., Платонова Н.М. Структурные и морфологические характеристики узлового зоба в условиях хронического дефицита йода. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2023;19(1):20-28. <https://doi.org/10.14341/ket12748>
6. Трошина Е.А., Маколина Н.П., Платонова Н.М., Исаева М.П., Абдулхабирова Ф.М., Никанкина Л.В., Зураева З.Т., Исаева У.С., Атабаева Х.В. Проблема йододефицитных заболеваний В Чеченской республике: оценка текущего состояния и пути решения. Проблемы Эндокринологии. 2023;69(4):38-49. <https://doi.org/10.14341/probl13306>
7. Панфилова Е.А., Крук Л.П., Исаева М.П., Османова П.О., Бостанова Ф.А., Трошина Е.А. Развитие болезни Грейвса на фоне длительно существующего первичного гипотиреоза в исходе аутоиммунного тиреоидита. Проблемы эндокринологии. 2020; 66(5): 24–30. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12420>
8. Панфилова Е.А., Исаева М.П., Трошина Е.А. Гипотиреоз: лекция для врачей первичного звена. Медицинский совет. 2020;(11):124–130. doi: 10.21518/2079-701X-2020-11-124-130

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 119 страницах, состоит из 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списков сокращений, условных обозначений и литературы, приложений.

Библиография включает 92 источника отечественной и зарубежной литературы.

Диссертация иллюстрирована 29 таблицами и 8 рисунками.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) ЩЖ являются самыми распространенными заболеваниями среди всех аутоиммунных патологий. Основными из них являются аутоиммунный тиреоидит (синонимы: тиреоидит Хашимото, лимфоцитарный тиреоидит/хронический тиреоидит) и диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса). Общим в патогенезе данных патологий является активация аутоиммунитета, выработка аутоантител (АТ) к тканям щитовидной железы (АТ к тиреоидной пероксидазе (ТПО), тиреоглобулину (ТГ), рецептору ТТГ), лимфоцитарная инфильтрация паренхимы железы. Воздействие многочисленных факторов окружающей среды на генетические детерминанты аутоиммунных нарушений активирует патологические процессы, лежащие в основе развития данных заболеваний.

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) — это хроническое заболевание ЩЖ, являющееся основной причиной гипотиреоза, характеризующееся повышенным титром АТ к ТПО и ТГ, лимфоидной инфильтрацией и постепенным прогрессированием деструктивных процессов в железе. Прогрессирование АИТ до гипотиреоза заключается в том, что в случае нарушения процессов аутоотолерантности, усиления лимфоцитарной инфильтрации ЩЖ и деструкции ее фолликулярного эпителия постепенно снижается синтез тиреоидных гормонов. В результате повышается уровень ТТГ, приводящий к гиперстимуляции ЩЖ. За счет этой гиперстимуляции на протяжении неопределенного времени может сохраняться продукция Т4 на нормальном уровне — фаза субклинического гипотиреоза. При дальнейшем разрушении ЩЖ число функционирующих тиреоцитов снижается ниже критического уровня, концентрация Т4 в крови также снижается (фаза явного гипотиреоза).

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Согласно данным многочисленных исследований отмечается тенденция к ежегодному росту распространенности и заболеваемости аутоиммунными патологиями [1,2]. Прогрессивный рост распространенности аутоиммунных заболеваний во всем мире, определяет актуальность проведения большого количества исследований, направленных на изучение причин и мер профилактики данных болезней современности. Одними из главных причин роста распространенности аутоиммунных патологий являются изменения факторов окружающей среды, таких как загрязнение воздуха, появление новых инфекционных агентов, а также изменения образа жизни и рациона питания человека, нарушения сна, уровень стресса. Также развитие и широкое внедрение в практику новых доступных диагностических методов способствуют активной выявляемости нарушений аутоиммунитета среди населения. АИТ является самой распространенной патологией среди

всех аутоиммунных заболеваний. Данные мета-анализа указывают, что среднее мировая распространенность АИТ среди взрослого населения составляет 7,5% [3]. В исследовании Фадеева В.В. Мельниченко Г.А. Ванушко В.Э., среди 260 пациентов (лица старше 60 лет, проживающие в домах престарелых г. Москва), «носительство» АТ к ТПО составило 16,9% [4]. А по результатам эпидемиологического исследования, проведенного в г. Новосибирск, в рамках международных проектов «MONICA» и «HAPPIE», повышенные показатели АТ к ТПО выявлены у 3,5%-16% обследуемых [5]. Распространенность АИТ вариабельна и зависит от географического региона, уровня йодного насыщения, обеспеченности другими микро- и макроэлементами (селен, цинк, витамин D) и уровня экономической развитости страны. Так, например, в Африке распространенность АИТ составила 14,2% (95% ДИ 2,5–32,9%), в Южной Америке и Европе 8,0%, в Северной Америке 7,8% (95% ДИ 0,0–29,5%) и 5,8 % (95% ДИ 2,8–9,9%) в Азии [3]. Распространенность АИТ наиболее высока среди женщин, частота встречаемости АИТ в женской популяции выше в 4 раза в сравнении с мужской [3,5–7]. С возрастом распространенность АИТ возрастает примерно в 2-4 раза, что подтверждено крупными исследованиями, такими как NHANES (National Health and Nutrition Examination) ( $p < 0,01$ ) [5,7].

АИТ является самой частой причиной гипотиреоза, особенно в йод-обеспеченных регионах [8]. Согласно данным Викгемского исследования (Whickham Survey), в котором за период с 1972 по 1995 гг. у 2779 человек оценивалась функция щитовидной железы, было показано, что риск развития гипотиреоза у женщины с изолированным повышением уровней АТ к ТПО (без нарушения ее функции) составил всего 2,1% в год. Согласно исследованию, проведенному в г. Новосибирске, у пациентов с повышенным уровнем ТТГ, повышенный уровень АТ к ТПО обнаружен в 22,2% случаев [5]. Примерно 30% случаев АИТ являются семейными формами, у монозиготных близнецов вероятность развития АИТ достигает 55%, в то время как у дизиготных близнецов — 7%. У половины братьев и сестер пациентов с АИТ обнаруживаются положительные значения антитиреоидных антител, что может свидетельствовать о наследственной предрасположенности к развитию АИТ и указывать на значительное влияние генетических факторов на возникновение этого заболевания.

В определениях большинства аутоиммунных заболеваний (сахарного диабета 1 типа, первичной надпочечниковой недостаточности, системной красной волчанки и др.) обозначены органоспецифические изменения, приводящие к определенным клиническим проявлениям, требующим лечения. Симптоматическое течение заболеваний вынуждает пациентов обращаться за медицинской помощью, что позволяет вести более точный учет распространенности данных нозологий. С АИТ не все так однозначно. Доступность

лабораторных методов исследований и их широкое применение приводят к высокой выявляемости «носительства» АТ к ТПО. Однако, учитывая клинические рекомендации и критерии постановки диагноза АИТ (гипотиреоз в сочетании с повышенным титром АТ и/или ультразвуковой - картиной аутоиммунных изменений щитовидной железы), диагноз АИТ устанавливается в большинстве случаев при наличии гипотиреоза, в связи с чем, оценка истинной картины «антителоносительства» затруднительна без проведения дополнительных эпидемиологических исследований. Также в форме федерального статистического наблюдения № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в районе обслуживания медицинской организации» АИТ объединен в группу тиреоидиты, наряду с гнойным, тиреоидитом де Кервена, Риделя, медикаментозным и другими хроническими формами. В результате эпидемиологические данные остаются ограниченными и противоречивыми и требуют дальнейших исследований.

Широкий перечень литературных данных демонстрирует доказанную ассоциацию аутоиммунных заболеваний друг с другом. В присутствии первичного аутоиммунного заболевания значительно возрастает риск развития других аутоиммунных патологий. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы являются одними из наиболее распространенных патологий среди пациентов с уже диагностированным аутоиммунным заболеванием, включая ревматологические, эндокринные, дерматологические, и гастроэнтерологические нарушения. Согласно данным одного из исследований у пациентов с АИТ в 14,3% случаев наблюдаются иные аутоиммунные нарушения, наиболее частыми из которых являются ревматоидный артрит, пернициозная анемия, системная красная волчанка, болезнь Аддисона, целиакия и витилиго [9], [10]. Результаты другого исследования демонстрировали высокую распространенность хронического аутоиммунного гастрита, витилиго, ревматической полимиалгии, сахарного диабета, болезни Шегрена, рассеянного склероза, саркоидоза, алопеции, псориазического артрита, системного склероза у пациентов с АИТ [11]. Диагностика нескольких аутоиммунных эндокринных заболеваний у одного пациента и выявление закономерностей и предрасположенностей к развитию нескольких аутоиммунных патологий у пациентов с первичным поражением появлялись с 1920х годов, задолго до возникновения специальной классификации. АИТ является самым частым компонентом аутоиммунных полигландулярных синдромов (АПС) 2 и 3 типов [12]. В рамках АПС 2 типа, основными компонентами которого являются первичная надпочечниковая недостаточность и одно и более аутоиммунных заболеваний: щитовидной железы, СД 1 типа, первичный гипогонадизм, тяжелая миастения и целиакия, алопеция, витилиго, пернициозная анемия и

др., частота развития АИЗЩЖ, в том числе АИТ составляет 69-82% [12]. Распространенность АИТ в составе АПС 3 типа, основными компонентами которого являются аутоиммунные заболевания ЩЖ и одно или несколько других аутоиммунных заболеваний, при отсутствии хронической первичной надпочечниковой недостаточности составляет около 20-30%. В практике врачей-эндокринологов самыми распространенными сочетанными аутоиммунными патологиями являются СД 1 типа и АИТ. Согласно результатам мета-анализа, каждый 4 пациент с СД 1 типа имеет повышенные титры АТ к тканям ЩЖ, а у каждого 10-го развивается гипотиреоз в исходе АИТ [13,14]. Согласно эпидемиологическому исследованию, проведенному в Великобритании распространенность АИТ у пациентов с СД 1 типа в 13,3 раза выше (ОШ = 13,3; 95% ДИ (11,8-14,9)) чем в популяции [15]. В настоящее время особый интерес вызывает сочетанность аутоиммунных эндокринопатий с другими аутоиммунными заболеваниями (ревматическими, гастроэнтерологическими, кожными и др.). Ревматоидный артрит (РА) является одной из самых распространенных патологий, ассоциированных с АИТ. По данным исследования (Boelaert et al., 2010), проведенного в Великобритании, распространенность РА составила 4,24% среди пациентов с АИТ. В литературе описана ассоциация аутоиммунных заболеваний ЩЖ и системной красной волчанки (СКВ) (Ferrari et al., 2017), распространенность повышенных титров антител к ТПО у пациентов с СКВ, по данным некоторых исследований, достигает 20-60%, а гипотиреоз развивается в 2 раза чаще, чем в популяции «относительно» здоровых лиц. Учитывая высокую распространенность АИТ среди пациентов с имеющимся аутоиммунным заболеванием, а также отсутствие специфических симптомов гипотиреоза, с целью своевременной диагностики важно однократно оценить АТ к ТПО в данной группе пациентов для определения риска развития нарушений функции ЩЖ.

Взаимосвязь двух аутоиммунных заболеваний ЩЖ – АИТ и болезни Грейвса (БГ) в настоящее время является одной из актуальных и интригующих тем. Положительные титры АТ к ТПО и/или АТ к ТГ у пациентов с БГ выявляются в 60% случаев. Конверсия БГ в гипотиреоз происходит у 10-15% пациентов после проведения медикаментозной антититреоидной терапии. Конверсия АИТ в БГ является редким явлением, в литературном обзоре (Daramjav et al., 2023) проанализированы данные 50 зарегистрированных пациентов с данными изменениями. Было отмечено, что среди пациентов, получающих терапию левотироксином натрия, средняя продолжительность гипотиреоза до перехода в БГ составила 7 лет. У данных пациентов выявлена более высокая частота встречаемости эндокринной офтальмопатии (7,8%), чем в среднем у пациентов с АИТ (4,3%). Существует несколько гипотез о причинах радикального перехода от одной формы аутоиммунного

заболевания ЩЖ к другой. Одной из них является преобладание блокирующего титра АТ к рТТГ у пациентов с АИТ. При переключении блокирующих антител на стимулирующие - изменение их концентрации, аффинности и эффективности, происходит стимуляция фолликулярных клеток ЩЖ, что приводит к гиперпродукции тиреоидных гормонов. Изменение баланса стимулирующих и блокирующих антител может происходить под как под влиянием терапии левотироксином натрия, так и под действием внешних факторов (вирусной инфекции, облучения области шеи). Однако однозначного подтверждения данной теории в настоящее время нет, так как не всем пациентам с АИТ измеряют АТ к рТТГ.

Эпидемиологические данные о распространенности АИТ остаются ограниченными и противоречивыми. Учитывая «доброкачественное» течение АИТ, изучение распространенности АИТ и факторов, влияющих на развитие и прогрессирование данных нарушений, позволят разработать оптимальные стратегии формирования групп риска и оптимизировать подходы к диагностике и лечению АИТ, что позволит улучшить качество жизни пациентов, минимизировав ненужные медицинские вмешательства и обеспечив своевременное выявление и лечение гипотиреоза.

## ЭТИОЛОГИЯ

Наличие временных связей между специфическим воздействием и дебютом аутоиммунного заболевания, усиление активности аутоиммунного процесса при воздействии определенного фактора и снижение данной активности при его отсутствии, отличия в распространенности заболеваний в разных географических регионах и изменения данного показателя со временем, низкий процент семейных форм аутоиммунных заболеваний позволяют полагать, что окружающая среда играет важную роль в развитии нарушений аутоиммунитета. В последние десятилетия все большее внимание уделяется исследованию внешних факторов в развитии аутоиммунных заболеваний. Возможность их модификации обуславливает актуальность исследований в данной области, что является основой для разработки методов профилактики развития и прогрессирования нарушений аутоиммунитета. Среди наиболее значимых внешних факторов, способных влиять на развитие АИТ, выделяют микро и макроэлементы (селен, витамин D, цинк, йод), являющиеся факторами регуляции функциональной активности органов и систем в организме человека, воздействие токсических веществ. Высокая распространенность аутоиммунных нарушений среди женщин обуславливает внимание к гинекологическому анамнезу и приему комбинированных оральных контрацептивов.

## Курение

Данные о влиянии табакокурения на функцию ЩЖ противоречивы, что вероятнее всего обусловлено гетерогенностью исследуемых групп, различиями стажа курения обследуемых, воздействием других факторов риска и большим количеством соединений, содержащихся в табаке, которые обладают разными эффектами, и концентрация которых различается в потребляемой табачной продукции [16]. Влияние курения на ЩЖ проявляется снижением продукции ТТГ и повышением уровней Т4 и Т3 [17]. Согласно исследованию NHANES III, у активных курильщиков преобладают низконормальные значения ТТГ по сравнению с некурящими людьми. В некоторых исследованиях показана, взаимосвязь количества выкуриваемых сигарет в сутки и снижения уровня ТТГ [18].

Самым известным компонентом табачных изделий является никотин, основным действием которого является влияние на нервную систему посредством нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов головного мозга. Активация симпатической нервной системы и метаболических процессов приводит к стимуляции ЩЖ: увеличению уровня тиреоидных гормонов и тиреоглобулина [19]. Одним из соединений, играющих ключевую роль в патогенезе различных заболеваний как у активных, так и у пассивных курильщиков является тиоцианат (SCN<sup>-</sup>). Данное вещество преобразуется в цианид, ингибирующий транспорт и органификацию йода—процессы, участвующие в синтезе тиреоидных гормонов, что может приводить к снижению их продукции [20]. Тиоцианат снижает уровень связанного Т4, в то время как фракция свободного Т4 повышается, что может объяснять изолированное повышение свободного Т4 у курящих пациентов.

Частота повышенных титров АТ к тканям ЩЖ у некурящих пациентов выше, чем у курящих, что продемонстрировано в многочисленных крупных исследованиях. Однако нет однозначного вывода о влиянии курения на прогрессирование гипотиреоза при АИТ. Некоторые исследования показывают отсутствие взаимосвязи статуса курения и наличия АТ к ТПО, но подтверждают более низкие показатели ТТГ при наличии курения в анамнезе [21]. У пациентов, бросивших курить, развитие гипотиреоза происходило чаще, чем в контрольных группах. Это состояние напрямую зависело от времени, прошедшего после отказа от курения, причем наибольшая распространенность гипотиреоза наблюдалась в течение первого года и уменьшалась с течением времени [18].

## Селен (Se)

В настоящее время, особое внимание уделяется изучению роли селена в развитии АИТ. Селен входит в состав селенсодержащих белков (глутатионпероксидазы, йодтиронин-дейодиназ, тиоредоксинредуктазы, селенопротеинов, метионинсульфоксидредуктазы), участвует в процессах антиоксидантной защиты тироцитов, конверсии активных форм

тиреоидных гормонов и поддержании клеточного гомеостаза, также обладает иммуномодулирующими свойствами [22]. Согласно результатам эпидемиологических исследований, выводы о влиянии дефицита селена на развитие патологий щитовидной железы неоднозначны. Многие исследования показывают более высокую распространенность как структурных, так и аутоиммунных заболеваний ЩЖ в зонах с низким содержанием селена в почве [23,24]. Однако, в других исследованиях взаимосвязи между уровнем микроэлементов в крови и распространенностью зоба, носительства АТ к ТПО и нарушений функции ЩЖ выявлено не выявлено [25]. У пациентов с АИТ в большинстве случаев определяется дефицит селена в крови, что обуславливает актуальность исследований влияния терапии препаратами селена на течение и исход АИТ [26]. Данные исследования активно проводятся последние десятилетия, однако улучшение функции ЩЖ у пациентов с БГ и АИТ на фоне данной терапии не наблюдается [27]. На фоне терапии селеном отмечается снижение концентрации АТ к ТПО в крови, без изменения уровней ТТГ, свТ4, однако в исследованиях Yifang Hu, Wenwen Feng схожие изменения отмечены только у пациентов с исходным дефицитом селена в крови [28]. Также в группе пациентов со сниженным уровнем селена и субклиническим гипотиреозом на фоне терапии препаратами селена отмечалось снижение ТТГ, когда в группах «условно здоровых» лиц данная терапия приводила к повышению ТТГ - данные результаты в исследованиях единичны. Учитывая расхождение результатов многочисленных исследований, рекомендация терапии селеном с целью профилактики прогрессирования нарушений функции ЩЖ пациентам с АИТ сомнительна.

### **Витамин D**

Витамин D относится к группе жирорастворимых витаминов. Человек получает этот витамин с пищей, а также синтезирует его в коже под воздействием ультрафиолетового излучения [29]. Множество крупномасштабных исследований показали, что дефицит витамина D связан с более высокой распространенностью АИТ в определенных группах населения, включая детей, подростков и лиц, страдающих ожирением [30–33]. Исследования указывают на потенциально более низкие уровни витамина D у пациентов с АИТ, однако наличие факторов (неоднородность исследуемой популяции, сезонность забора крови, вредные привычки), которые могут исказить результаты и противоречивые данные исследований, по результатам которых не обнаружено существенных различий в уровнях витамина D между пациентами с АИТ на всех стадиях заболевания и контрольной группой ограничивают возможность формирования однозначных выводов [34,35].

Отдельно изучается взаимосвязь уровня витамина D и титром антитиреоидных АТ. Многие исследования доказали четкую взаимосвязь между низким уровнем витамина D и

титрами АТ, а именно снижением титров антитиреоидных АТ после восполнения дефицита витамина D [36]. Отмечается роль витамина D и в профилактике развития аутоиммунных процессов. По данным рандомизированного контролируемого исследования VITAL (США), в котором приняли участие 25871 человек прием колекальциферола в дозе 2000МЕ в сутки в течение 5 лет снизил риск развития любого аутоиммунного заболевания на 22% [37].

Большая часть работ, в которых проводилась оценка взаимосвязи витамина D и АИТ сосредоточена на уровне АТ к ЩЖ, как основном маркере аутоиммунной агрессии. Однако потенциальная взаимосвязь может касаться и других иммунологических механизмов. Так, Botelho и соавторы в результате своего исследования пациентов с АИТ и здоровых добровольцев не выявили значимой корреляции между уровнем 25 (ОН) D и уровнями некоторых провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$ ) в сыворотке крови, однако отметили положительную корреляцию между IL-17, TNF- $\alpha$  и IL-5 [38]. Согласно исследованиям, витамин D поддерживает баланс между Th1/Th2 - лимфоцитами, ингибирует развитие Th17- лимфоцитов и способствует дифференцировке Treg которые, секретируя противовоспалительные цитокины, подавляют усиление аутоиммунного ответа [39,40]. В- лимфоциты, также экспрессируют рецептор витамина D. Воздействуя путем ингибирования на дифференцировку наивных В- лимфоцитов и их созревание до плазматических клеток, потенциально снижаться выработка АТ. Rolf и соавторы аналогично представили витамин D как иммуномодулирующий гормон и указали четыре потенциальных механизма воздействия на аутоиммунитет при АИТ: (1) предотвращение АПК-зависимой активации Т- лимфоцитов; (2) понижающая регуляция экспрессии гена HLA II в ЩЖ; (3) влияние на В- лимфоциты и (4) восстановление соотношения Th17 / Tregs [41,42].

В настоящее время отсутствуют убедительные доказательства положительного влияния терапии витамином D на исходы и течение АИТ. Поэтому на данный момент не рекомендуется рассматривать терапию витамином D в качестве профилактического средства для данного заболевания.

### **Йод (I)**

Йод является важным микроэлементом, который оказывает значительное влияние на функционирование ЩЖ и участвует в синтезе ее гормонов. Йод поступает в организм человека с пищей из морепродуктов (тунец, лосось, креветки и др.), молочных продуктов, яиц, некоторых фруктов (клубника и клюква) и овощей. В условиях йодного дефицита для всех возрастных групп населения возрастает риск развития патологий ЩЖ, таких как диффузный нетоксический зоб, узловой и многоузловой коллоидный нетоксический и



токсический зоб, гипотиреоз (в условиях тяжелого йодного дефицита). Решением проблемы йодного дефицита является внедрение государственных программ об обязательном использовании йодированной соли. Многолетний опыт использования йодированной соли в регионах с йодной недостаточностью убедительно показал снижение распространенности патологии ЩЖ, однако в отношении аутоиммунных заболеваний есть противоречивые данные. Ряд исследований показал увеличение распространенности повышенных титров АТ к ТПО и АТ к ТГ на фоне пятилетнего использования йодированной соли. В исследовании проведенном в Дании, при использовании точки cut-off для уровня АТ к ТПО и АТ к ТГ, соответствующей используемым значениям в клинической практике, распространенность АТ к ТПО возросла с 11,4% до 14,1% ( $p < 0,001$ ), а достоверных различий в анализе на АТ к ТГ не выявлено [43]. В других исследованиях была показано большая распространенность повышенных титров АТ к ТПО в регионах с избыточным потреблением йода, в сравнении с умеренным [44,45]. Однако исследование, проведенное в Китае, не показало достоверных различий в распространенности повышенных показателей АТ к ТПО и АТ к ТГ в регионах с умеренным, достаточным и избыточным потреблением йода [46]. Исследования, посвященные использованию применения йода в физиологических и фармакологических дозах на течение АИТ показывают, что применение физиологических доз йода (100 мкг/сутки) в течение 6 месяцев не оказывают существенного влияния на развитие и прогрессирование АИТ: не выявлены статистически значимые изменения уровней ТТГ и объема ЩЖ в группе «носителей» АТ к ТПО и контрольной группе [47]. Влияние фармакологических доз (более 1 мг/сутки), которые содержатся в медикаментозных препаратах (амиодарон, раствор Люголя, рентгенконтрастные вещества), на лиц с генетической предрасположенностью к развитию аутоиммунных заболеваний проявляется повышенным риском развития гипотиреоза в исходе АИТ. Всегда следует соотносить с риск и пользу от назначения данных незаменимых препаратов, и рассматривать пациентов, принимающих терапию препаратами с высоким содержанием йода, как группу риска развития гипотиреоза и проводить им динамическую оценку уровня ТТГ [48,49]. Влияние высоких доз йода на развитие АИТ обусловлено множественными патогенетическими механизмами. Во-первых, избыточное потребление йода активирует синтез различных воспалительных медиаторов, таких как цитокины и хемокины, что способствует рекрутированию иммунокомпетентных клеток в область ЩЖ, инципируя аутоиммунный ответ. Во-вторых, увеличение концентрации йода индуцирует окислительный стресс, приводящий к повреждению тиреоидных клеток. В-третьих, повышение уровня йодирования ТГ увеличивает его иммуногенность, что способствует его распознаванию и атаке иммунной системой.

Учитывая неоднородные данные, представленные в исследованиях относительно распространенности АИТ в регионах с разной йодной обеспеченностью, а также принимая во внимание многофакторную этиологию данного заболевания, формулировка однозначного заключения о влиянии йода на патогенез АИТ оказывается затруднительной. Для оптимального управления состоянием ЩЖ и профилактики аутоиммунных заболеваний необходимо поддерживать нормальный уровень потребления йода, избегая как дефицита, так и избытка данного микроэлемента.

### **Репродуктивная система и АИТ**

Высокая распространенность АИТ среди женщин предполагает взаимосвязь данного заболевания с факторами, связанными с репродуктивной функцией. Во время беременности, до 10-12 недель, пока не сформировалась собственная ЩЖ у ребенка, возрастает нагрузка на ЩЖ матери. Тиреоидные гормоны активно переносятся от матери к плоду через плаценту, усиливается экскреция йода с мочой, что снижает доступность йода для производства тиреоидных гормонов и требует дополнительного приема йода извне; под действием эстрогенов происходит увеличение объема плазмы крови у матери, что приводит к повышению циркулирующего тироксин-связывающего глобулина, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), гормон плаценты со слабой активностью агониста рецептора ТТГ, напрямую стимулирует клетки ЩЖ к синтезу и секреции периферических гормонов, а под действием плацентарной дейодиназы типа 3 усиливается деградация тиреоидных гормонов – данные изменения приводят к более активному синтезу гормонов ЩЖ для поддержания их физиологических концентраций. В результате в первом триместре беременности, характеризующимся пиком секреции ХГЧ, уровни ТТГ в сыворотке крови матери обычно низкие, а уровни свТ4 повышены. Во время беременности в иммунной системе матери происходят также значительные изменения, наибольшее значение, среди которых имеют противовоспалительные процессы, позволяющие организму адаптироваться к наличию плода. Основные иммуномодулирующие эффекты во время беременности опосредуются высокими концентрациями прогестерона, который способствует дифференцировке Т-лимфоцитов в Th2, а не Th1, и подавляет выработку провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$  и TNF- $\beta$ , вредных для плода. Процесс адаптации иммунной системы под влиянием прогестерона, приводящий к доминированию цитокинов Th2 во время беременности, считается защитным механизмом, подавляющим материнский иммунный ответ на антигены плода и предотвращающим чрезмерную реакцию на внешние вредные стимулы.

Наличие повышенного титра АТ к ТПО, является фактором риска снижения функции ЩЖ во время беременности и в послеродовом периоде. Аутоиммунные изменения

ЩЖ могут ослабить функциональную способность ЩЖ адекватно реагировать на увеличение потребности в тиреоидных гормонах во время беременности. По данным исследований у пациенток - «носителей» АТ к ТПО на фоне высоких концентраций ХГЧ уровень свТ4 оставался низким, что является косвенным фактором ослабленного ответа ЩЖ на стимуляцию ХГЧ [50,51]. Учитывая описанные изменения, возникают вопросы: происходит ли нормализация функции ЩЖ после родов у пациенток с нарушениями аутоиммунитета? В случае повторных беременностей сохраняется ли способность к адаптации изменений? В первый год после родов выявляется наибольшее количество манифестаций аутоиммунных заболеваний ЩЖ. Причинами этого могут быть нормализация уровней эстрогена и прогестерона и неполное восстановление механизмов клеточного и гуморального звеньев иммунитета после иммунологической супрессии [52]. Микрохимеризм- это длительное сохранение генетически чужеродных эмбриональных клеток у матерей спустя годы после беременности, и сохранение материнских клеток у потомства в течение всего постнатального развития до зрелого возраста [53]. Несмотря на тот факт, что микрохимерные клетки обнаруживаются у большинства людей, роль микрохимеризма в послеродовом развитии аутоиммунных заболеваний противоречива. Согласно исследованиям, у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как системный склероз, первичный билиарный цирроз, синдром Шегрена, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, а также АИТ в периферической крови найдено большее количество циркулирующих микрохимерных клеток [54,55], однако существуют исследования, которые не показали существенные различия в содержании данных клеток. Развитие и прогрессирование аутоиммунных реакций могут быть обусловлены фетальными или материнскими Т- лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и НК-клетками, которые вместе с локально продуцируемыми цитокинами и хемокинами могут запускать аутоиммунный процесс. В настоящее время крупными популяционными исследования не подтверждена взаимосвязь между беременностями, абортами и появлением АТ к тканям ЩЖ, что не позволяет рассматривать микрохимеризм в качестве одной из основных причин развития аутоиммунных заболеваний ЩЖ [56]. Нет достаточных данных, подтверждающих однозначное увеличение риска развития АИТ в связи с увеличением количества беременностей. Тем не менее, существует гипотеза, что многократные беременности могут вызывать кумулятивные изменения в иммунной системе. Эти изменения могут потенциально снижать её способность к дальнейшей адаптации, что, в свою очередь, может приводить к прогрессированию нарушений аутоиммунитета. У пациенток с АИТ, на фоне приема КОК, отмечается снижение уровней АТ к ТПО, но без положительного эффекта на функцию ЩЖ, в связи с чем терапия КОК

является неэффективной в качестве меры профилактики АИТ и может использоваться при отсутствии противопоказаний со стороны других систем [57,58].

## ГЕНЕТИКА

В основе развития АИТ лежит сложное взаимодействие генетических факторов и факторов окружающей среды. Семейные случаи заболевания составляют 20-30% случаев АИТ (ОР=16,9). У монозиготных близнецов вероятность развития АИТ составляет 29-55%, у дизиготных 0-7%. У 50% братьев и сестер пациентов с АИТ в крови определяются положительные титры АТ к ТПО [59]. В настоящее время оценена важность как основного комплекса гистосовместимости (Jacobson & Ansari, 2018), так и генов, не относящихся к нему, как фундамента предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний. В общегеномных ассоциативных исследованиях (GWAS) доказана связь между развитием АИТ, наличием высокого титра АТ к ТПО и некоторых генов, большинство из которых ответственны за функцию Т- лимфоцитов: *IL2RA*, человеческий лейкоцитарный антигена (*HLA*), *PTPN22* и *CTLA4*, *FCRL3*, ген рецептора ТТГ [60]. Также обнаружена взаимосвязь с геном, ответственным за морфогенез ЩЖ в части связывания элементов ответа с ТГ и ТПО - *FOXE1*; и генами, экспрессируемыми на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т- лимфоцитах - *GDCG4p14* и *RNASET2*, и во время созревания В- лимфоцитов - *BACH2* [61].

## ПАТОГЕНЕЗ АИТ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК И АНТИТЕЛ

С целью поиска новых диагностических маркеров прогрессирования АИТ, целевых молекул для создания таргетной иммунологической терапии, в настоящее время, научные исследования направлены на подробное изучение патогенеза АИТ. Мышиные модели являются ключом к изучению молекулярно-генетических механизмов многих патологий, в том числе аутоиммунных. Экспериментальные животные модели аутоиммунных заболеваний бывают спонтанные и индуцированные. Животные модели АИТ достигаются путем классической иммунизации восприимчивых мышей аутоантигенами ЩЖ или использованием аденовирусного вектора, несущего человеческие последовательности ключевых аутоантигенов ЩЖ. Наиболее изученная индуцированная модель - мыши линии NOD (Non-obese diabetic). Согласно протоколам индукции АИТ (использование йодсодержащей питьевой воды- 0,05% NaI) у данных мышей наблюдаются следующие процессы: на 3-4 неделю использования питьевой воды с высокой концентрацией йода обнаружены признаки хронического воспаления в крови, повышенные концентрации АТ к ТГ и АТ к ТПО в крови у животных, активная секреция провоспалительных цитокинов,

клеточная инфильтрация (CD4+/CD8+ Т- лимфоциты, В- лимфоциты, НК клетки, дендритные клетки) ткани ЩЖ, активация антителозависимой цитотоксичности клеток, которая приводит к лизису тироцитов, атрофии ЩЖ; выявлены повышенные концентрации перфорины, гранзима, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , поддерживающих хроническое воспаление. Потеря иммунологической толерантности за счет снижения активности Т-регуляторного звена приводит к развитию АИТ в 100% иммунизации [62,63].

На основании данных научных исследований показано, что в основе развития АИТ лежат патологические процессы взаимодействия клеточного и гуморального звеньев иммунитета, которые приводят к формированию нарушенной ауто толерантности. Прогрессирование АИТ может быть результатом потери центральной толерантности (дефекты селекции Т- лимфоцитов в тимусе), дисфункции периферической толерантности (дефекты апоптоза аутореактивных Т- лимфоцитов и ингибирования активности Т-регуляторных клеток), нарушения процессов анергии. В настоящее время остаются нерешенными вопросы - какой антиген является основным в инициации процессов нарушения аутоиммунитета и какой процесс является первичным в развитии АИТ. Исследования не позволяют дать однозначный ответ, однако известно, что дефекты презентации антигенов, накопление антигенпрезентирующих клеток (АПК), таких как макрофаги и дендритные клетки, в ЩЖ и аномальная экспрессия молекул МНС класса II фолликулярными клетками ЩЖ под действием IFN- $\gamma$  иницируют активацию Т-лимфоцитов, и представляют собой ключевые механизмы, ведущие к развитию АИТ, которые активизируют и поддерживают процессы воспаления и разрушения ЩЖ. (Ajjan & Weetman, 2007; Sarah et al., 2018). Презентация антигенов ЩЖ АПК приводит к активации процессов дифференцировки Т- лимфоцитов в Th1, Th2, Th17 и Treg, и индукции нескольких механизмов, которые запускают процессы разрушения ЩЖ/ Th1- лимфоциты секретируют IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и активируют в основном цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги, которые нацелены на разрушения фолликулярных клеток ЩЖ (фагоцитоз, активация апоптоза). Th2- лимфоциты, продуцируя IL-4, IL-5, IL-10, активируют В- лимфоциты, иницируют процессы выработки аутоантител к аутоантигенам ЩЖ, которые запускают антитело зависимую цитотоксичность и активацию комплемента, приводя к апоптозу тироцитов.

В последнее десятилетие иммунологические исследования все чаще выделяют ключевую роль баланса Th1/Th2 в поддержании иммунного гомеостаза и развитии АИТ. Дисбаланс Th1/Th2, выражающийся в преобладании клеток одного типа над другим, был идентифицирован в ряде работ, как ключевой фактор в развитии и прогрессировании АИТ (O'Garra A. & Arai N., 2000; Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger

В., 2006). Эти данные подкрепляются более современными исследованиями, в которых обнаруживается, что сбой в регуляции между Th1 и Th2 клетками может способствовать не только развитию, но и процессу поддержания аутоиммунитета.

Кроме того, внимание исследователей привлекают недавно выявленные подтипы Т-лимфоцитов, включая Th17 и Treg, которые играют важную роль в поддержании иммунного ответа и развитии аутоиммунных реакций (Zhu J., Yamane H., Paul W.E., 2010). Недавние исследования указывают на важность изучения роли Th17 и Treg клеток наряду с классическим дисбалансом Th1/Th2 в контексте аутоиммунных заболеваний, включая АИТ, что может открыть новые подходы к лечению и профилактике таких заболеваний (Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K., 2009).

Основной функцией Treg является подавление патологического иммунного ответа. Данную задачу Treg выполняют с помощью запуска каскада реакций и продукции ряда цитокинов- TNF-  $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-10, IL-35. По данным исследований у пациентов с АИТ кол-во Treg, обладающих супрессивными свойствами, было снижено и определялись субпопуляции Treg, которые не обладали иммуносупрессивными свойствами [64].

Th17- лимфоциты секретируют IL-17, способствуя запуску процессов апоптоза и некроза тироцитов, за счет стимуляции макрофагов, фибробластов и эпителиальных клеток вырабатывать множество провоспалительных цитокинов. Примечательно, что при АИТ наблюдается дисбаланс Th17/Treg: снижение кол-ва и ослабление Treg- лимфоцитов, которые противодействуют противовоспалительной активности Th17, что приводит к увеличению Th17- лимфоцитов (Yu et al., 2019; Zhang et al., 2020). Активация провоспалительных Th17 и ослабление Tregs рассматриваются как два ключевых механизма, способствующих потере толерантности и прогрессированию аутоиммунных нарушений при АИТ. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что терапевтическое вмешательство с целью коррективы соотношения Th17/Treg может быть потенциальным направлением для разработки новых методов лечения АИТ, направленных на восстановление иммунного баланса.

Важным компонентом патогенеза АИТ является не только активация клеточного звена иммунитета, но и активация гуморального иммунитета против антигенов ЩЖ. Выработка аутоантител способствует усилению аутоиммунного ответа. Основными тиреоидными антигенами, которые могут индуцировать опосредованный антителами иммунный ответ являются: ТГ, ТПО и активно изучаемые пендрин и симпортер Na/I (NIS). АТ к ТПО в настоящее время остаются единственным прогностическим маркером гипотиреоза при АИТ. Учитывая внутриколлоидное функционирование ТПО, данный фермент не может инициировать выработку аутореактивных АТ, в связи с невозможностью

проникновения АТ через плотные соединения тироцитов для связывания с антигеном. Тем не менее, в условиях, когда эти соединения нарушены, АТ к ТПО могут способствовать развитию аутоиммунного ответа, в том числе через комплемент- и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, что ведёт к прогрессированию разрушения тканей и усилению воспалительной реакции в ЩЖ [65].

Более 90% пациентов с АИТ имеют положительный титр АТ к ТГ в крови АТ к ТГ. Антитела играют вспомогательную, но не менее значимую роль в патогенезе АИТ. Тиреоглобулин является спусковым фактором активации NK- клеток и макрофагов, которые с помощью процессов клеточно-опосредованной цитотоксичности приводят к уничтожению тироцитов. Исследования на животных моделях АИТ показали, что АТ к ТГ появляются ранее, чем АТ к ТПО, что предполагает первоначальное участие ТГ в активации Т и В клеточных звеньев аутоиммунологической толерантности. АТ к пендрину и NIS могут быть обнаружены у некоторых пациентов с АИТ, однако четкого понимания их роли в развитии аутоиммунного процесса и их клинической значимости в настоящее время нет [66,67]. Требуется дополнительные исследования для определения возможности использования данных АТ в рамках диагностики и прогноза у пациентов с АИТ.

Продукция антител является ключевой функцией В- лимфоцитов. Кроме того, эти клетки способствуют аутоиммунному ответу за счет представления антигена Т-лимфоцитам, усиливая воспалительный процесс в ЩЖ. В 2002 году среди популяции В-лимфоцитов были выделены клетки, обладающие регуляторной активностью. С помощью выработки противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-35, TFN- $\beta$ ), цитотоксических молекул гранзима В и активации поверхностных молекул FASL, PDL-1 Breg поддерживают периферическую толерантность, подавляя иммунные реакции, опосредованные Т-лимфоцитами, особенно Th1, Th17, активируя процессы апоптоза Т- лимфоцитов, а также активируя конверсию Treg. Согласно результатам исследований, у пациентов с АИТ в периферической крови выявляется или сниженное кол-во Breg в сравнении с “здоровыми” донорами, или нормальное или повышенное кол-во, сопровождается дисфункцией клеток, характеризующейся недостаточность экспрессии IL-10 [68].

Согласно исследованиям, проведенным на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ, совместно с ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, установлены различия в содержании регуляторных клеток (CD19<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>D24<sup>hi</sup> B reg) при инкубации *in vitro* без дополнительной активации в крови у пациентов с АИТ и «здоровых» доноров. Обращает на себя внимание, что достоверные различия выявлены в группе «носителей» аутоантител к тканям ЩЖ (1.75%; 3.0%;  $p=0,0003$ ) и у пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС (1.5%; 3.0%;

$p=0,0002$ ). Однако, снижение индукции Breg IL-10 наблюдалось только в группе пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС (2.3%,  $p=0,04$ ), в то время как в группе «носителей» АТ к тканям ЩЖ индукция была сопоставима с группой «здоровых» доноров. Данные наблюдения требуют дальнейшего изучения. Полная картина патогенеза АИТ представлена на рисунке 3.

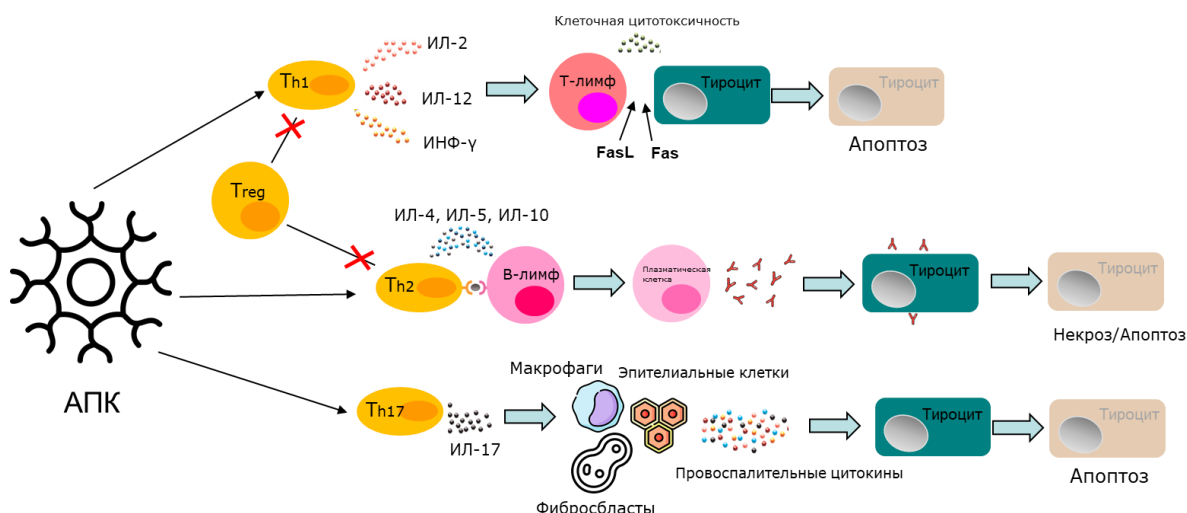


Рисунок 1. Механизмы разрушения ткани ЩЖ при АИТ (адапт. European Thyroid Journal 11, 1; 10.1530/ETJ-21-0024)

Для окончательного осознания важности взаимодействия множества факторов в патогенезе АИТ, А.Р. Weetman предложил «швейцарскую модель», изображенную как швейцарский сыр его многочисленными отверстиями. Каждое из этих отверстий символизирует различные факторы: генетические, факторы окружающей среды. Заболевание манифестирует только в том случае, если все эти «дыры» совпадают таким образом, что через них может пройти стрела, символизирующая возникновение болезни [69].

## ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ АИТ

Диагноз АИТ является лабораторным. Клиническая картина гипотиреоза является неспецифичной. Лабораторные данные: анализ крови на АТ к ТПО и АТ к ТГ, ТТГ и визуализирующие исследования- УЗ-картина аутоиммунного процесса позволяют диагностировать АИТ. Имеющийся диагностический спектр является недостаточным. В 5-10% случаев встречаются серонегативные формы АИТ, при которых выявлен гипотиреоз, однако титры АТ к ТПО и АТ к ТГ отрицательны [70]. УЗ- диагностика является операторозависимым методом, при отсутствии «насмотренности» возникают трудности дифференцировки УЗ-картины аутоиммунного процесса и наличия истинных узловых новообразований. Активное внедрение искусственного интеллекта, как помощника врача,



является приоритетным направлением в лучевой диагностике, позволяет улучшить точность и эффективность обнаружения изменений в ЩЖ. Применение алгоритмов машинного обучения для анализа ультразвуковых изображений способствует выявлению характерных признаков АИТ, обеспечивая более высокую воспроизводимость и объективность результатов в сравнении с традиционными методами.

МикроРНК — это малые некодирующие РНК, ключевые регуляторы экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, играющие важную роль в разнообразных биологических процессах, включая дифференциацию, пролиферацию и апоптоз клеток. Модуляция уровня экспрессии специфических микроРНК способна оказывать значительное влияние на данные биологические процессы, что может способствовать развитию патологий. Современные научные исследования фокусируются на изучении роли микроРНК в патогенезе АИТ, а также рассматривают их потенциальное применение в диагностических и терапевтических целях [71]. МикроРНК-146а ассоциируется с регуляцией воспаления и иммунного ответа, что позволяет рассматривать данную молекулу значимым маркером для АИТ. Она также влияет на регуляцию Treg, подчеркивая свою роль не только в АИТ, но и БГ [72]. МикроРНК-301а участвует в регуляции активации NF-κB, важных для функционирования Th17- лимфоцитов, которые играют ключевую роль в иммунном ответе и развитии АИТ. Повышение микроРНК-301а-5p у пациентов с АИТ также рассматривается, как возможный диагностический маркер данного заболевания [73,74]. Анализ профилей экспрессии микроРНК и их целевых генов в контексте заболеваний ЩЖ и других аутоиммунных состояний представляет собой важный этап в понимании патогенетических механизмов данных заболеваний и разработке инновационных терапевтических подходов. Однако, для комплексного овладения этими механизмами необходимы дополнительные исследовательские усилия.

Ввиду гетерогенности клеточных популяций в крови и возникающих трудностей при определении специфических изменений, обусловленных сосуществованием множественных патологий у одного человека, особое внимание уделяется необходимости проведения детального анализа клеточных компонентов непосредственно в тканях пораженных органов. Современные исследования, посвященные изучению АИТ, сосредоточены на идентификации и характеристике специфических аутореактивных В-лимфоцитов, а также на изучение молекулярной структуры их специфичных рецепторов и формировании соответствующих библиотек антител. В то же время, технические сложности, связанные с обработкой тканей ЩЖ и ограниченное количество экстрагируемых специализированных клеток, ставят перед научным сообществом задачу разработки уточненных методологических подходов для обеспечения достоверности

исследовательских результатов. В контексте исследований аутоиммунных заболеваний особый интерес представляет разработка мультиплексных иммуноаналитических методов, способных выявлять сигнатуры аутоантител, для ранней диагностики ассоциированных патологий. Активно разрабатываются экспериментальные наборы усовершенствованных биочипов, обеспечивающих возможность одновременного обнаружения множества антител. В перспективе предвидятся новые направления в молекулярных и генетических исследованиях АИТ, включая разрешение существующих проблем в стандартизации диагностических критериев.

### **КОМОРБИДНОСТЬ ЙОДОДЕФИЦИТНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И АИТ**

Распространенность аутоиммунных заболеваний ЩЖ в разных странах мира зависит от йодной обеспеченности. В регионах с низким потреблением йода, лидирующее место занимают йододефицитные тиреопатии, а в странах, где успешно применена йодная профилактика, относительная частота аутоиммунной патологии среди всех заболеваний ЩЖ увеличена, за счет снижения ЙД тиреопатий. Отсутствие йодной профилактики и сохраняющийся йододефицит не предотвратят рост заболеваемости АИТ. В йододефицитных регионах, за счет широкого спектра тиреоидной патологии, существуют сложности дифференциальной диагностики тиреопатий, в связи с сочетанием у одного и того же пациента аутоиммунных и ЙД заболеваний ЩЖ [49,75].

На сегодняшний день существуют спорные и косвенные доказательства роли йода в развитии аутоиммунных патологий. Стимулирующее влияние избытка йода на развитие АИЗЩЖ широко освещено в литературе. Эти данные получены как в экспериментах на животных, так и при изучении состояния ЩЖ при приеме фармакологических (а не физиологических) доз йода, содержащихся в некоторых лекарственных препаратах. При изучении влияния физиологических доз йода на функции ЩЖ у пациентов с АИТ негативные эффекты не выявлены. Рост распространенности узлового зоба и АИЗЩЖ в йододефицитных регионах вызывает интерес исследователей к изучению возможного влияния АИТ на развитие злокачественных изменений узловых образований ЩЖ. АИТ определен как сопутствующее заболевание, которое вносит сложности в проведение тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) узловых образований ЩЖ из-за структурных изменений ткани ЩЖ на фоне АИТ, а также в трудности оценки рецидива онкологических заболеваний ЩЖ при мониторинге уровня сывороточного ТГ в присутствии АТ к ТГ. Также АИТ рассматривается как фактор, ассоциированный с более доброкачественными формами рака ЩЖ [76].

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа состоит из трех исследований, представленных в соответствующих разделах глав и включающих разных пациентов и здоровых участников. Графическая схема работы представлена на рисунках 1, 2, 3.

Первое исследование является одномоментным и включает в себя обследование 605 лиц, старше 18 лет, проживающих в регионах сопоставимых по йодной обеспеченности и численности населения - Тульской области и Чеченской Республике (согласно исследованиям, проведенным в 2022 году ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ, в Тульской области медиана йодурии 69,1 мкг/л, в Чеченской Республике 71,3 мкг/л) [4,6]. В рамках данного исследования изучается распространенность «носительства» АТ к ТПО, факторы риска развития и прогрессирования АИТ, сочетанность АИТ и (много) узлового зоба. Набор пациентов проводился в период с июня по июль 2022г.

Второе исследование является одномоментным сравнительным, включает в себя обследование 123 лиц, старше 18 лет, которые обратились за медицинской помощью в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (директор – д.м.н., профессор, академик РАН Н.Г. Мокрышева): отделе терапевтической эндокринологии (руководитель- д.м.н., Н.М. Платонова) или обращались за медицинской консультацией в консультативно-диагностический центр (руководитель – д.м.н., профессор Н.Н. Волеводз) в период с 2023 по 2024 гг. В рамках данного исследования изучаются механизмы нарушений иммунологической толерантности у пациентов с АИТ: оценивается содержание Т и В регуляторных клеточных звеньев и других субпопуляций лимфоцитов. Оценка содержания субпопуляций лимфоцитов проводилась в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (директор – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН О.А. Свитич): лаборатория биосинтеза иммуноглобулинов (заведующий – к.б.н. И. Н. Дьяков). Гормональные и иммунологические (определение уровня АТ) исследования проводились в клинικο-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ (заведующий – к.м.н. Л. В. Никанкина).

В рамках третьего исследования проведен ряд экспериментов оценки содержания ТГ и ТПО специфичных В- лимфоцитов в ткани ЩЖ у пациентов с АИТ. Все участники исследования проходили обследование и лечение в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (директор – д.м.н., профессор, академик РАН Мокрышева Н.Г.): в отделе хирургии (руководитель- д.м.н., Кузнецов Н.С.) и обращались за медицинской консультацией в консультативно-

диагностический центр (руководитель – д.м.н., профессор Волеводз Н. Н.) в период с 2022 по 2024 гг. по поводу узловых образований ЩЖ разной степени злокачественности и имели сопутствующее заболевание - АИТ. Фундаментальная часть исследования проводилась на базе ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» (директор – академик, д.м.н. А.Г. Габибов): лаборатория химии протеолитических ферментов (руководитель - д.м.н., член-корреспондент РАН И.В. Смирнов). Гормональные и иммунологические (определение уровня АТ) исследования проводились в клинко-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России (заведующий – к.м.н. Л. В. Никанкина).

## **2.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ**

### **2.1.1. Участники исследования**

В исследовании приняли участие жители Тульской области (n=287) и Чеченской Республики (n=318), соответствующие критериям включения и исключения. Приглашения для участия в исследовании были размещены в центральных районных больницах Надтеречного, Шалинского, Веденского районов Чеченской Республики и в ГБУ «Республиканский эндокринологический диспансер» г. Грозный и в центральных районных больницах Ясногорского, Арсеньевского и Щекинского районов Тульской области, в связи с чем выборка лиц смещена в сторону лиц имеющих то или иное хроническое неинфекционное заболевание (ХНИЗ) (сахарный диабет, артериальная гипертензия, злокачественные новообразования и др.) и наблюдающихся по поводу них в указанных медицинских учреждениях.

Объем выборки рассчитывался исходя из ожидаемой распространенности АИТ (согласно данным мета-анализа- 7,5% [3]), уровня достоверности 95% и допустимой погрешностью  $\pm 2-3\%$ . Для расчета использовалась формула  $n=(Z^2 \cdot P \cdot (1-P))/d^2$ , где Z- фактор, применяемый для определенного доверительного интервала (для 95%- 1,96), P- ожидаемая распространенность и d- допустимая погрешность. При подсчете для бесконечной популяции требуемый объем выборки составил 297-667 участников.

#### **Общие критерии включения:**

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше;
3. проживание на территории Тульской области или Чеченской республики;

**Критерии исключения** отсутствуют.

### **2.1.2. Дизайн исследования**

Исследование является одномоментным, наблюдательным. Способ формирования выборки – произвольный. Жители Ясногорского, Арсеньевского и Щекинского районов Тульской области и Надтеречного, Шалинского, Веденского районов Чеченской Республики и г. Грозный были приглашены в центральные районные больницы, где мобильная бригада, состоящая из специалистов ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ (врачи-эндокринологи, специалисты УЗ диагностики), провела обследование с целью поиска и оценки тиреоидной патологии, в период с 8 по 10 июня и с 28 июня по 1 июля 2022 года соответственно.

Обследование включало в себя анкетирование, сбор информации анамнестического характера о факторах наследственности, наличии вредных привычек, эндокринной патологии и ряда сопутствующих заболеваний, приеме медикаментозных препаратов, гинекологическом анамнезе у женщин (шаблон анкеты представлен в приложении 1); забор биоматериала для лабораторного исследования на базе клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ (определение в сыворотке крови уровней ТТГ, свободных фракций Т4, АТ к ТПО); осмотр врача-эндокринолога (пальпация ЩЖ, измерение роста, веса); УЗ-исследование ЩЖ с оценкой объема ЩЖ, наличием узловых новообразований, признаков аутоиммунных изменений ЩЖ. При проведении анкетирования были получены неполные данные, в связи с отказом участников исследования отвечать на определенные вопросы анкеты.

Уровень АТ к ТПО в крови был оценен только у 580 пациентов. 25 пациентов были исключены из анализа, в связи с отказом от проведения лабораторного обследования. Пациенты были разделены на две группы по уровню АТ к ТПО: «носители» АТ к ТПО (АТ к ТПО  $\geq 5,6$  МЕ/мл),  $n=143$  и лица с АТ к ТПО - (АТ к ТПО  $< 5,6$  МЕ/мл),  $n=437$ . Показатель 5,6 МЕ/мл является верхним референсным значением анализа АТ к ТПО в сыворотке крови, проводимом в клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ. Схема исследования представлена на рисунке 2.

### **2.1.3. Методы исследования**

#### **2.1.3.1. Клинические методы исследования**

Осмотр врача-эндокринолога включал в себя пальпацию ЩЖ, измерение роста, массы тела, сбор анамнестических данных с использованием вопросов анкеты (приложение

1). В ходе анкетирования сбор анамнестических данных был проведен не у всех участников исследования, в связи с отказом участников от осмотра врача-эндокринолога, содержащего сбор анамнестических данных.

### **2.1.3.2. Лабораторно-инструментальные методы исследования**

В рамках выездных мероприятий проведен забор крови 580 участникам исследования, 25 участников отказались от сдачи крови и были исключены из анализа данных. Забор крови осуществлялся в вакуумные пробирки BD Vacutainer®. Образцы крови центрифугировали (1500 об/минуту в течение 10 минут), сыворотку переносили в одноразовые пробирки типа Эппендорф. В день забора крови образцы биоматериала транспортировали на холоде (+ 6-7°C) в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ и подвергали заморозке при температуре -20–25°C.

На базе клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ проводили определение уровней ТТГ, свободных фракций Т4, АТ к ТПО с помощью метода хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе ARCHITECT i2000 (Abbott). Референсные интервалы (РИ) для гормональных показателей крови составляли: ТТГ – 0,25-3,5 мМЕ/л, св.Т4 -9,0-19,0пмоль/л; для иммунологических показателей: АТ к ТПО – 0- 5,6 МЕ/мл. В ходе исследования оценка лабораторных показателей была проведена не у всех участников в связи с рядом ограничений, возникших на преаналитическом этапе в связи с транспортировкой материала: гемолиз образцов, приведший к невозможности выполнения измерений. Повторный забор материала у участников был невозможен.

Ультразвуковое исследование ЩЖ было проведено 605 участникам исследования. Исследование выполнялось по стандартной методике в положении лежа с использованием портативного УЗ - аппарата LOGIQe (China) с мультитемновым линейным датчиком 10–15 МГц. Объем ЩЖ рассчитывался с учетом ширины, длины и толщины каждой доли и коэффициента поправки на эллипсоидность. Описание узловых образований ЩЖ проводили с использованием EU-THIRADS.

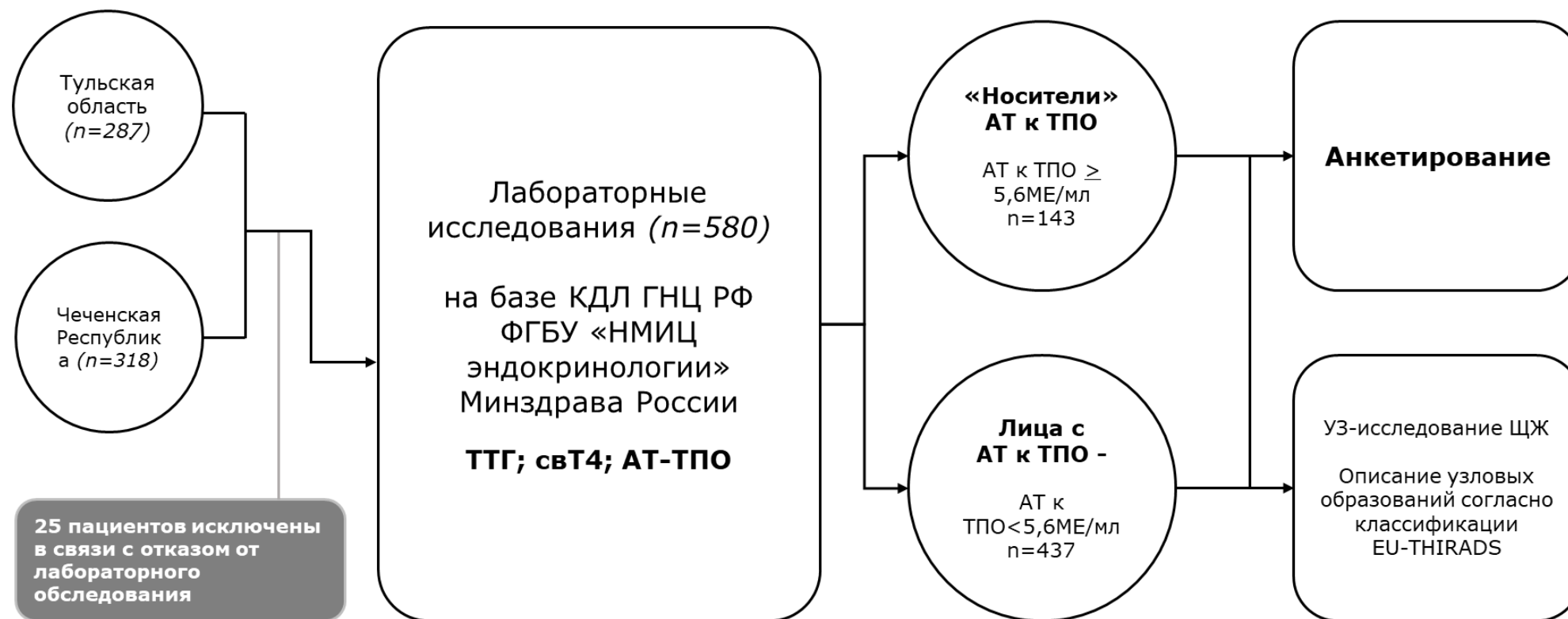


Рисунок 2. Схема исследования: оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ

## **2.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ**

### **2.2.1. Участники исследования**

К участию в исследовании были приглашены пациенты, имеющие повышенный уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в крови и соответствующие критериям включения и исключения. Набор осуществлялся среди лиц, которые обратились за медицинской помощью в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ с целью плановой госпитализации в отдел терапевтической эндокринологии в соответствии с показаниями, согласно клиническим рекомендациям и среди пациентов, которые обратились за медицинской консультацией в консультативно-диагностический центр в период с сентября 2023 по май 2024 гг.

Участники исследования распределены на 3 группы: с сохранной функцией ЩЖ и повышенными показателями АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови («носители» АТ к тканям ЩЖ) (n=27), с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ (n=46), с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС 2 и 3 типов (n=30). Дополнительно была набрана группа лиц, у которых в анамнезе отсутствовала информация о заболеваниях ЩЖ и в крови которых определялся нормальный уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ (контрольная группа) (n=20). Данная группа была набрана как среди лиц, обратившихся за медицинской помощью в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ, так и из сотрудников ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ в период с сентября 2023г. по май 2024 г. Для участия в группе условно здоровых лиц осуществлялся подбор участников по полу и возрасту к пациентам других групп.

#### **Общие критерии включения:**

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше.

#### **Критерии включения для группы «носители» АТ к тканям ЩЖ:**

1. уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови выше референсных значений лаборатории и/или по данным заключений УЗ-исследования ЩЖ были выявлены признаки аутоиммунных изменений ЩЖ;
2. ТТГ в крови 0,4-4,0 мМЕ/л;
3. отсутствие в анамнезе данных о нарушении функции ЩЖ, хирургическом лечении на ЩЖ, принимаемой терапии гормонами щитовидной железы или тиреостатической терапии.

#### **Критерии включения для группы лиц с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ:**



1. уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови выше референсных значений лаборатории и/или по данным заключений УЗ-исследования ЩЖ были выявлены признаки аутоиммунных изменений ЩЖ;
2. установленный диагноз – гипотиреоз в исходе АИТ, в соответствии с клиническими рекомендациями – Е06. 3, Е03. 8;
3. Отсутствие других аутоиммунных заболеваний в анамнезе – СД 1 типа, первичной надпочечниковой недостаточности, первичного гипопаратиреоза, витилиго, хронического аутоиммунного гастрита, целиакии.

**Критерии включения для группы лиц с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС 2 и 3 типов:**

1. уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови выше референсных значений лаборатории и/или по данным заключений УЗ-исследования ЩЖ были выявлены признаки аутоиммунных изменений ЩЖ;
2. установленный диагноз- гипотиреоз в исходе АИТ, в соответствии с клиническими рекомендациями – Е06. 3, Е03. 8;
3. Наличие других аутоиммунных заболеваний в анамнезе – СД 1 типа, первичной надпочечниковой недостаточности, первичного гипопаратиреоза, витилиго, хронического аутоиммунного гастрита, целиакии.

**Критерии включения для лиц контрольной группы:**

1. уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови в пределах референсных значений лаборатории;
2. ТТГ в крови 0,4-4,0 мМЕ/л;
3. отсутствие в анамнезе данных о нарушении функции ЩЖ, хирургическом лечении на ЩЖ, принимаемой терапии гормонами щитовидной железы или тиреостатической терапии.

**Критерии исключения:**

Характеристики были выявлены согласно данным опроса и предоставленной медицинской документации.

1. беременность, период лактации;
2. острые инфекции;
3. обострение хронических заболеваний;
4. тяжелые, угрожающие жизни состояния: декомпенсация ХСН, ХБП С3б и более, лёгочная и печёночная недостаточности;
5. тяжелые психические заболевания;

6. патология иммунной системы (включая врождённые и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании;
7. приём препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики);
8. проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование;
9. наличие злокачественных онкологических заболеваний.

Дополнительно в ходе исследования группы были распределены по полу. А группа лиц с гипотиреозом, развившимся на фоне АИТ в структуре АПС 2 и 3 типов была распределена на подгруппы в зависимости от количества аутоиммунных заболеваний: подгруппа с двумя аутоиммунными заболеваниями (n=25), тремя заболеваниями (n=3), с четырьмя заболеваниями (n=2).

### 2.2.2. Дизайн исследования

Исследование является наблюдательным, одномоментным, сравнительным. Всем участникам исследования проведено клинико-лабораторное обследование на базе клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ и дополнительно проведен забор цельной крови для анализа содержания и оценки степени индукции иммунокомпетентных клеток, который проводился на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Транспортировка образцов биоматериала осуществлялась в день забора крови на холоде (+6-7 С).

Анализ Т-клеточного состава цельной крови (CD4,CD8 Т-лимфоциты; IFN $\gamma$  Т-лимфоциты (Th1); IL-4 Т-лимфоциты (Th2); IL-17 Т-лимфоциты (Th17); CD25FoxP3(Treg)) был проведен у 16 участников из группы пациентов с изолированным АИТ, у 8 лиц «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ, 10 участников с АИТ в составе АПС синдрома и у 6 лиц контрольной группы.

Анализ В- регуляторного звена (CD19+38hi/24 hi Breg; B10- лимфоциты) был проведен у 40 участников из группы пациентов с изолированным АИТ, у 27 лиц «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ, 30 участников с АИТ в составе АПС синдрома и у 20 лиц контрольной группы. Для обеспечения достоверности результатов были исключены результаты с выраженным отклонением (CD19+38hi/24 hi Breg от общего количества В-лимфоцитов после активации неспецифическим антигеном  $\leq 1\%$  и  $>10\%$ ; B10- лимфоциты от общего количества В-лимфоцитов после активации неспецифическим антигеном  $\leq 1\%$  и  $>45\%$ ).

Анализ содержание В-клеток памяти (CD24hiCD27+, IL-10продуцирующие клетки памяти) проведен у 20 участников из группы пациентов с изолированным АИТ, у 8 лиц «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ, 10 участников с АИТ в составе АПС синдрома и у 7 лиц контрольной группы.

Ограничением исследования явилась неполнота данных по оценке клеточного состава крови у части участников, обусловленная техническими артефактами при проведении анализов.

Схема исследования представлена на рисунке 3.

## **2.2.3. Методы исследования**

### **2.2.3.1 Клинические методы исследования**

Осмотр врача-эндокринолога включал в себя пальпацию ЩЖ, измерение роста, массы тела, сбор анамнестических данных.

### **2.2.3.2 Лабораторные методы исследования**

Забор крови из периферической вены для клинико-диагностического исследования проводился всем участникам исследования утром натощак и осуществлялся в вакуумные пробирки BD Vacutainer®. На базе клинико-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ проводили определение уровней ТТГ, свободных фракций Т4, АТ к ТПО и АТ к ТГ с помощью метода хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе ARCHITECT i2000 (Abbott). Референсные интервалы (РИ) для гормональных показателей крови составляли: ТТГ – 0,25-3,5 мМЕ/л, св.Т4 -9,0-19,0пмоль/л; для иммунологических показателей: АТ к ТПО – 0- 5,6 МЕ/мл, АТ к ТГ – 0-115 МЕ/мл.

### **2.2.3.3. Иммунологические методы исследования**

Оценка содержания и степени индукции иммунокомпетентных клеток (CD19CD38hi/CD24hiBreg; B10- лимфоциты; CD3/CD4/IFNg, CD3/CD4/IL-17, CD3/CD4/IL-4 Т- лимфоциты; CD4/CD25 Treg) проводились на базе лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Транспортировка образцов биоматериала осуществлялась в день забора крови на холоде (+ 6-7°C). Протоколы используемых методик описаны ниже.

1. Выделение мононуклеарных клеток (PBMC): 7,0-7,5 мл цельной крови наслаивали на среду на основе фиколла с плотностью 1,077 г/мл (*Capricorn; Sigma*) для сепарации лимфоцитов и центрифугировали при 1200g в течение 25мин. PBMC собирали микропипеткой на границе сред плазмы крови и среды для сепарации и разбавляли фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) (*Пан-ЭКО, Россия*) минимум в 3 раза. Затем клетки осаждали при 400g в течение 10 мин, ресуспендировали в 10 мл *DPBS* и снова осаждали при 400g в течение 10мин.
2. Полученные клетки замораживали по 5 млн в 1 мл ЭТС (сыворотка крови эмбриональная телячья, *Capricorn, Германия*) с 10% диметилсульфоксидом, смешанным с криосредой для заморозки КриоМед-М (*ПанЭКО, Россия*) в кельвинаторе на -70°C с использованием камеры для заморозки клеток, позволяющей снижать температуру суспензии постепенно на 1°C в минуту. Клетки хранили при -70°C не более 2 мес.
3. Для проведения дальнейших манипуляций клетки размораживали на водяной бане

при +38 °C - +40°C до полного растворения льда, после чего переносили в 12 мл полной среды, содержащей 10% ЭТС, глутамин (*Gibco, США*), антибиотики и NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин.

4. Индукция иммунокомпетентных клеток *in vitro*: PBMC вносили в лунки плоскодонных культуральных 96-луночных планшетов по 106 клеток в 150 мкл полной среды RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium; Gibco, США*) с 10% ЭТС, 2мМ глутамина, 1мМ пирувата (*Gibco, США*), 100 Ед/мл пенициллина (*Gibco*), 100 мкг/мл стрептомицина (*Gibco, США*). Затем к клеткам добавляли 0,2 мкл блокатора секреции GolgiPlug (*BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit with BD GolgiStop, США*) для блокировки секреции продуцируемых цитокинов. Части клеток дополнительно добавляли неспецифические активаторы параметоксиамфетамина в дозе 50 нг/мл (PMA) (*Sigma-Aldrich, США*) и 500 нг/мл иономицина (*Sigma- Aldrich, США*) для активации внутриклеточной продукции цитокинов и усиления дальнейшего внутриклеточного окрашивания. Все клетки инкубировали в течение 12 ч при +37 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе при содержании 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере. По окончании инкубации, клетки собирали и окрашивали антителами к *IFN $\gamma$* , *IL17*, *IL4*, *IL10* а также к поверхностным маркерам *CD3*, *CD4*, *CD19*, *CD38*, *CD 24*, *CD27*, *CD25*. При подготовке клеток к окрашиванию использовали набор для фиксации и пермеабилзации клеток BD Cytofix/Cytoperm™ Plus (*BD Biosciences, США*). Клетки собирали из лунок, осаждали и при 400g 5мин, удаляли среду, ресуспендировали осадок, отмывали 2 раза 1мл Stain buffer, ресуспендировали в 1мл Stain buffer, считали клетки. Распределяли пробы по пробиркам, добавляли 0,5 мл Stain buffer, осаждали, ресуспендировали. Все упомянутые буферы входят в состав набора.

5. Поверхностное окрашивание: к ресуспендированным клеткам добавляли 40 мкл Stain buffer и по 4,5 мкл антител на пробу:

- APC/Cyanine7 – меченные антитела к CD3,
- PE/Cyanine7-меченные антитела к CD19,
- FITC-меченные антитела к CD38,
- PE –меченные антитела к CD24,
- PerCP/Cyanine5.5- меченные антитела к CD27,
- PE/Cyanine7 - меченные антитела к CD25.

Клетки и меченные антитела перемешивали и инкубировали 30 мин при +4 °C. Отмывали 2 раза в 0,5 мл Stain buffer, центрифугируя при 400g в течение 5 минут.

Каждый раз перед центрифугированием перемешивали клетки на Vortex. Добавляли во все пробы буфер Fix/Perm (*BD Biosciences, США*) по 200 мкл в пробу, перемешивали и инкубировали 20 мин при +4 °C. Отмывали 2 раза в 0,5 мл буфером Perm/Wash (*BD Biosciences, США*), центрифугируя при 400g в течение 5 минут. К ресуспендированным клеткам добавляли 30 мкл буфера Perm/Wash и 20 мкл антител к определяемым цитокинам: APC-меченые антитела к IL-10, IL17, IL4, FITC-меченные антитела к IFN $\gamma$ . Инкубировали 30 мин при +40 °C. Клетки отмывали 2 раза в 0,5 мл буфером Perm/Wash, центрифугируя при 400g в течение 5 минут. Затем клетки фиксировали в 0,4 мл 2% растворе параформальдегида.

Процент Т- и В- лимфоцитов определяли от лимфоцитарной зоны PBMC, а содержание субпопуляций – от исходной популяции В- или Т- лимфоцитов на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (*Becton Dickinson, США*).

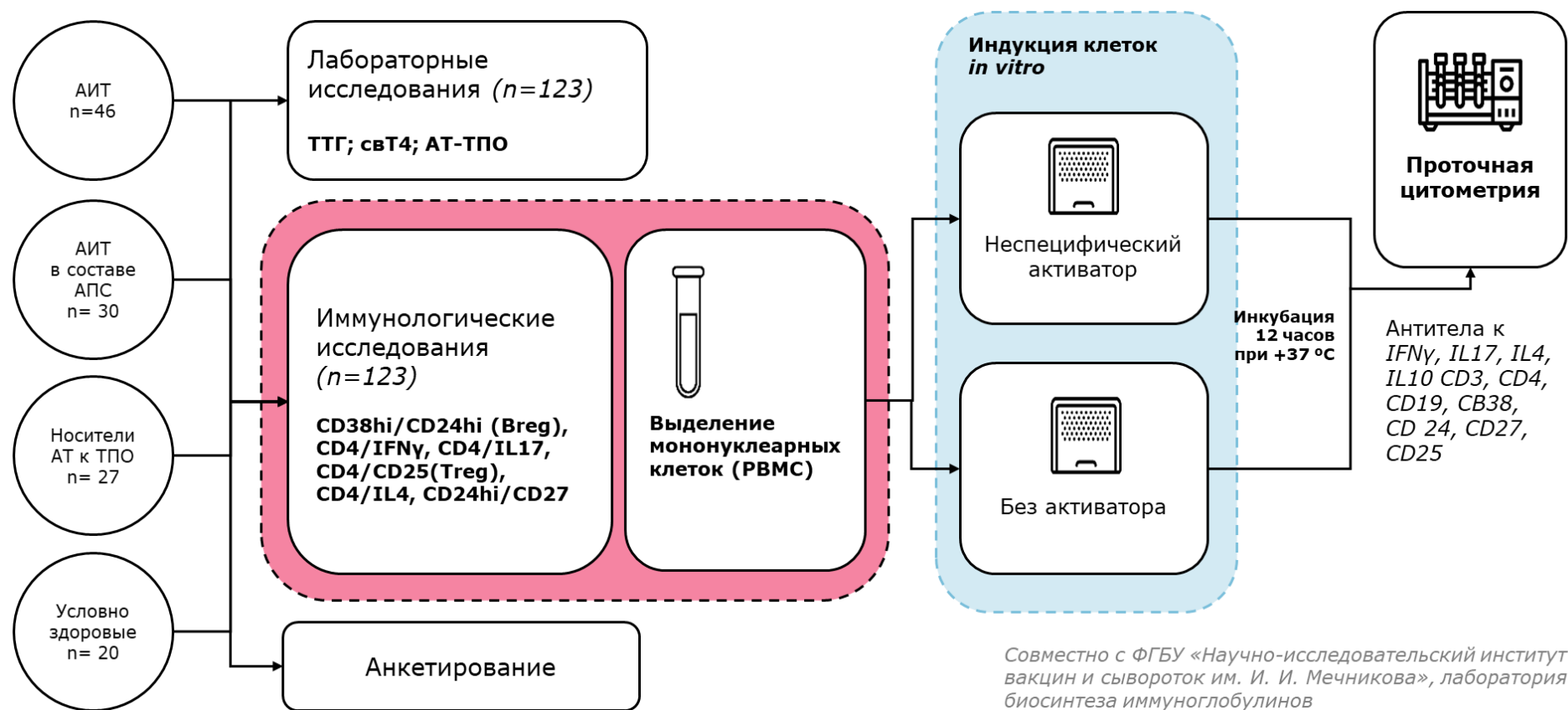


Рисунок 3. Схема исследования: изучение нарушений механизмов иммунологической толерантности при АИТ

## **2.3. Оценка количества Т- и В- лимфоцитов, в т.ч. ТГ-, ТПО-специфических В-лимфоцитов в ткани ЩЖ и крови пациентов**

### **2.3.1. Участники исследования**

В исследование включены пациенты, проходившие обследование в консультативно-диагностическом центре и лечение в отделе хирургии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологи им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ по поводу узловых образований ЩЖ разной степени злокачественности и имеющие сопутствующее повышение уровня АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови. Дополнительно была набрана группа пациентов, проходивших обследование и лечение по поводу узловых образований ЩЖ разной степени злокачественности и имеющих нормальные уровни АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови и отсутствие аутоиммунных заболеваний ЩЖ в анамнезе. Формирование выборки пациентов осуществлялось произвольным способом, с июня 2022 года по январь 2024 года. Набор пациентов в группы проводился на основании соответствия критериям включения и критериям исключения.

#### **Критерии включения общие для всех групп:**

1. мужской и женский пол;
2. возраст 18 лет и старше.

#### **Критерии включения в группу с нормальным уровнем АТ к к ТПО и/или ТГ (АТ к ТПО и/или ТГ - ):**

1. уровень АТ к ТПО и АТ к ТГ в сыворотке крови в пределах референсных значений лаборатории;
2. уровень ТТГ в сыворотке крови 0,4-4,0 мМЕ/л;
3. Отсутствие признаков аутоиммунного поражения по данным ультразвукового исследования ЩЖ;
4. Отсутствие данных в анамнезе о наличии аутоиммунных заболеваний;
5. Наличие признаков узловых образований ЩЖ по данным ультразвукового исследования, соответствующие показаниям к проведению ТАБ (EU-THIRADS 2, размер более 2,5 см; EU-THIRADS 3, размер более 2,0, EU-THIRADS 4-5, размер более 1,0 см) или наличие признаков узловых образований ЩЖ по данным УЗ-исследования или большого объема ЩЖ, с признаками компрессии трахеи, которые требуют оперативного лечения.

#### **Критерии включения в группу «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ:**

1. уровень АТ к ТПО и/или АТ к ТГ в сыворотке крови выше референсных значений лаборатории;



2. Наличие признаков узловых образований ЩЖ по данным УЗ- исследования, соответствующие показаниям к проведению ТАБ (EU-THIRADS 2, размер более 2,5 см; EU-THIRADS 3, размер более 2,0, EU-THIRADS 4-5, размер более 1,0 см) или наличие признаков узловых образований ЩЖ по данным УЗ- исследования или большого объема ЩЖ, с признаками компрессии трахеи, которые требуют оперативного лечения.

#### **Критерии исключения (общие для всех групп)**

1. Диффузно-токсический зоб;
2. Беременность, период лактации;
3. Злоупотребление алкоголем, психотропными веществами;
4. Наличие тяжелых психических заболеваний;
5. Острые состояния, в том числе обострение хронических заболеваний, а также инфекции;
6. Наличие иных онкологических заболеваний;
7. Наличие других заболеваний иммунной системы, кроме аутоиммунных (допускается наличие в анамнезе реакций гиперчувствительности, вне периода обострения);
8. Постоянный прием препаратов, влияющих на иммунную систему (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики);
9. Проведение вакцинаций/ревакцинаций в течение месяца перед включением в исследование;
10. Отказ пациента участвовать в исследовании.

#### **2.3.2. Дизайн исследования**

Наблюдательное одномоментное исследование, которое состоит из двух этапов:

1) анализ содержания субпопуляций Т- и В- лимфоцитов в пунктатах ЩЖ и крови у пациентов с узловыми образованиями различной степени злокачественности и сопутствующим повышенным уровнем АТ к ТПО и/или АТ к ТГ (n=5) (с гипотиреозом и без нарушений функции ЩЖ) и у лиц с узловыми образованиями ЩЖ без признаков аутоиммунных заболеваний ЩЖ (n=2);

2) анализ содержания лимфоцитов в послеоперационных образцах ткани ЩЖ в аналогичных группах пациентов (n=12).

Для создания экспериментальных групп образцов пунктатов ЩЖ на первом этапе исследования к участию были приглашены лица, у которых по результатам УЗИ ЩЖ было выявлено узловое образование ЩЖ, соответствующее показаниями к проведению ТАБ (EU-THIRADS 2, размер более 2,5 см; EU-THIRADS 3, размер более 2,0, EU-THIRADS 4-5,

размер более 1,0 см) и в анамнезе была информация о наличии АИТ. Для распределения пациентов по группам, был осуществлен забор периферической венозной крови, оценен уровень АТ к ТПО и АТ к ТГ, ТТГ и проведен сбор анамнеза. По результатам данных мероприятий участники были разделены на группы: «носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ (n=5) и АТ к ТПО и/или ТГ - (n=2).

Всем участникам была проведена ТАБ контралатеральной доли ЩЖ, вне узлового образования (с согласия пациента на дополнительную пункцию) в консультативно-диагностическом отделении ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ. Полученные образцы в смеси из среды RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, раствор дипептида L-аланил-L-глутамин GlutaMAX с финальной концентрацией 2 мМ, антибиотик и антимикотик (полная среда RPMI) и криоконсерванта КριοМед (*Панэко, Россия*), на холоде 5-6 °С были транспортированы в ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», где проводились дальнейшие исследования для анализа содержания Т- и В- лимфоцитов в пунктатах ЩЖ. Дополнительно у пациентов был проведен забор цельной периферической крови, которая на холоде 5-6 °С также транспортировалась в ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» для дальнейшей оценки содержания лимфоцитарного клеточного звена.

Во второй этап исследования включены пациенты (n=12), обратившиеся за медицинской помощью в отдел хирургии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ для проведения оперативного лечения на ЩЖ в связи с наличием узловых новообразований высоко риска злокачественности или компрессии трахеи в связи с большим объемом ЩЖ, и у которых по данным лабораторного исследования был выявлен повышенный уровень АТ к ТГ и/или АТ к ТПО (как с гипотиреозом, так и без нарушения функции ЩЖ) и/или аутоиммунные изменения ЩЖ по данным УЗ-исследования, выполненного экспертными специалистами ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ. Также набрана группа пациентов, которые обратились для проведения оперативного лечения заболеваний ЩЖ, но не имели признаков нарушений аутоиммунитета ЩЖ (АТ к ТПО и/или ТГ -). Всем пациентам проведено клиничко-лабораторное обследование (оценка ТТГ, АТ к ТПО и АТ к ТГ), осмотр врача-эндокринолога. После удаления ЩЖ (тотальная тиреоидэктомия и/или односторонняя резекция ЩЖ) был взят образец послеоперационной ткани - участок, наиболее удаленный от узлового образования (при его наличии) и с наибольшей степенью лимфоцитарной инфильтрации (при ее наличии) по данным макроскопического осмотра препарата (у пациентов с повышенными уровнями АТ к ТПО и/или ТГ в сыворотке крови).

Биологические образцы ткани ЩЖ были транспортированы в ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» для выделения, окраски и анализа содержания клеток. Схема исследования представлена на рисунке 4.

Для анализа клеток были отработаны методы выделения клеток из пунктатов и ткани ЩЖ и подобраны и оптимизированы условия окрашивания клеток для достижения максимальной чувствительности детекции.

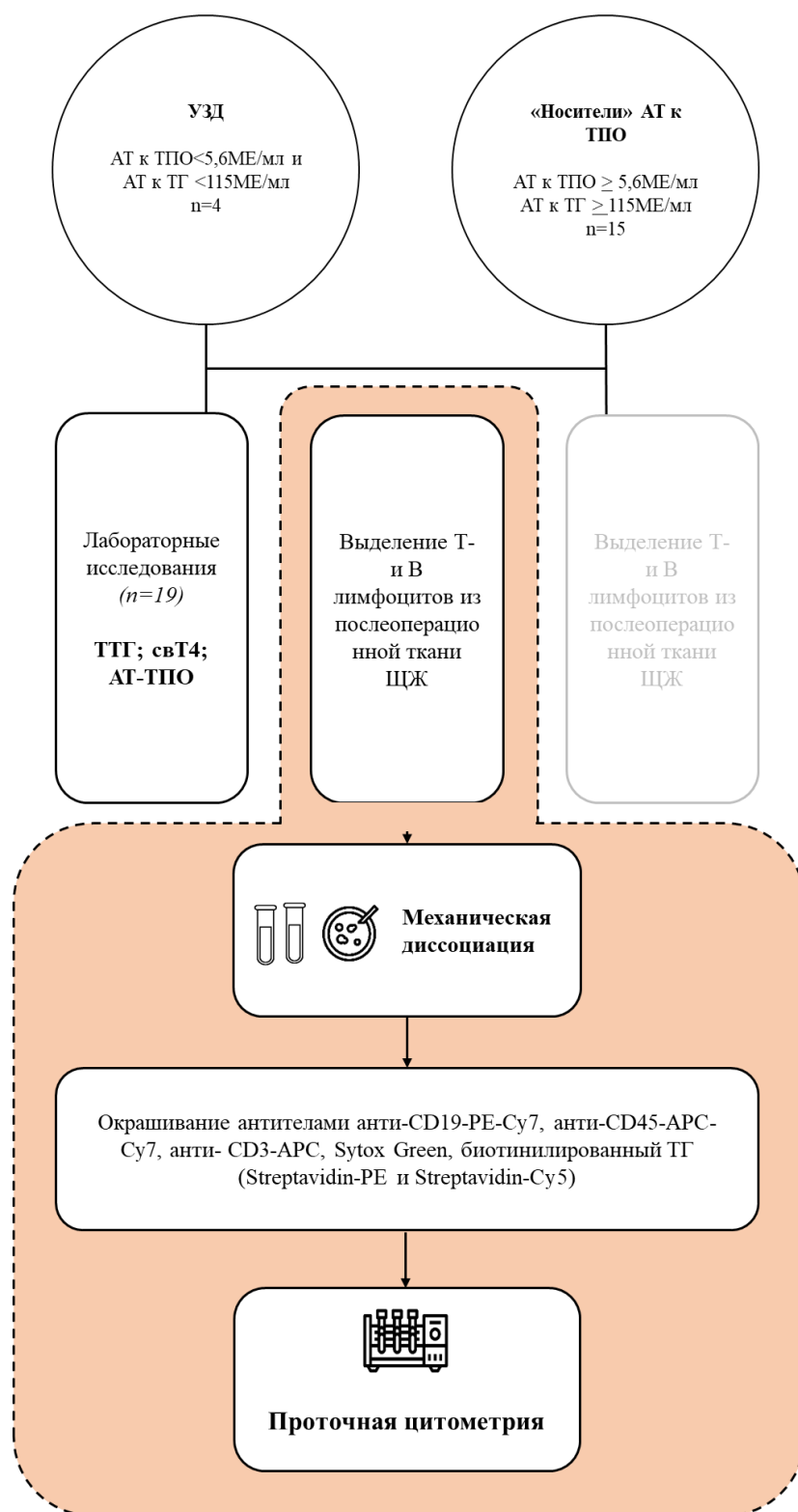


Рисунок 4. Схема исследования: Оценка количества Т- и В- лимфоцитов, в т.ч. ТГ-, ТПО-специфических В- лимфоцитов в ткани ЩЖ и крови пациентов.

### 2.3.3. Методы исследования

1. Клинические методы исследования проводились в соответствии с разделом 2.2.3.1.
2. Лабораторные методы исследования проводились в соответствии с разделом 2.2.3.2
3. Тонкоигольную аспирационную биопсию контрлатеральной доли щитовидной железы относительно наличия узлового образования проводили согласно протоколу проведения ТАБ с соблюдением условий асептики и антисептики. Полученные пунктаты замораживали в смеси среды RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, раствор дипептида L-аланил-L-глутамин GlutaMAX с финальной концентрацией 2 мМ, Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:100 (полная среда RPMI) с добавлением криоконсерванта Криомед-М (ПанЭко, Россия). Хранили при -70°C не более 2 мес.
4. Для выделения клеток из послеоперационных образцов ткани ЩЖ использовали метод механической диссоциации. Первым этапом тканевые образцы сразу после проведённого оперативного вмешательства в нативном виде оценены врачом патологоанатомом референс-центра ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ с целью выбора репрезентативных участков: исключение участков фиброза, выраженных кровоизлияний, коагуляционных изменений. Далее стерильным скальпелем производилась вырезка необходимого фрагмента ткани размером до 1,0 см. Для получения суспензии клеток образцы ткани ЩЖ промывали фосфатно-солевым буфером (*Phosphate-Buffered Saline 1x w/o Calcium, Magnesium pH7.4, Франция*). Ткань осаждали центрифугированием 300g в течение 10 минут при комнатной температуре. На чашке Петри с добавлением 2 мл полной питательной среды RPMI измельчали ткань с использованием скальпеля, далее продолжали измельчение в механическом гомогенизаторе в 4-5 мл среды. Полученную суспензию фильтровали через клеточное сито с размером ячейки 70 мкм. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием 300g в течение 10 минут. Далее добавляли лизирующую смесь ACK (*ACK Lysing Buffer, Thermo Fisher Scientific, США*) 1 мл на 1 минуту, после чего нейтрализовали ее 10 мл полной питательной средой RPMI. Далее промывали клетки питательной средой RPMI и осаждали центрифугированием 200g в течение 7 минут. Подсчет клеток проводили в 1 мл питательной среды с окраской трипановым синим. Образцы замораживали с использованием среды Криомед-М (ПанЭко, Россия) из расчета 20 тысяч клеток в 1 мл, в кельвинаторе на -70°C с использованием камеры для заморозки клеток, позволяющей снижать температуру суспензии постепенно на 1°C в минуту. Клетки хранили при -200°C не более 2 месяцев в азоте.

5. Выделение клеток из образцов цельной крови проводили согласно методике описанной в разделе 2.2.3.3 пункты 1 и 2.
6. Для окрашивания аутоантиген специфичных В-лимфоцитов проводили подбор оптимальных условий окрашивания для максимальной степени детекции клеток.

#### 6.1 Подготовка антигенов:

а) В качестве антигенов для детекции аутоантиген специфических В-лимфоцитов использовали коммерчески доступный белок - ТГ, выделенный из крови человека (*Sigma-Aldrich, США*) и рекомбинантную ТПО синтезированную в эукариотической системе экспрессии (*проект ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН»*). При использовании коммерчески доступного белка ТПО, полученного в бактериальной системе экспрессии в клетках *Escherichia coli* (*eTPO, Cloud-Clone, KHP*), были выявлены ограничения связывания антигена с антителами. Коммерческая ТПО синтезируется в прокариотических клетках. Особенности экспрессии в данной системе привели к неполной представленности эпитопов в структуре белка. В связи с низким сигналом связывания коммерческой ТПО и антител в сравнении с сигналом, полученным при использовании стандартного диагностического набора Anti-TPO ELISA (*Euroimmun, Германия*) было принято решение использовать рекомбинантную ТПО синтезированную в эукариотической системе экспрессии, с максимально близкими к нативным свойствами.

#### б) Химическое биотинилирование.

Для окраски антиген-специфичных В-лимфоцитов использовали биотинилированные комплексы ТГ и ТПО и двух флуоресцентно-меченых конъюгатов стрептавидина Streptavidin-PE и Streptavidin-Cy5.

- Биотинилированный ТГ получали путем соединения коммерческого белка ТГ, выделенного из крови человека (*Sigma-Aldrich, США*) и свежего 10mM раствора биотина- EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (*Thermo Fisher Scientific, США*) в PBS (pH 7.2). Раствор биотинилирующего агента добавляли к раствору белка с 20 кратным избытком, перемешивали, реакционную смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре.

Биотинилированную ТПО получали путем добавления раствора биотинилирующего агента к раствору синтезированной рекомбинантной ТПО в эукариотической системе (*проект ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН»*)

с 60 кратным избытком, перемешивали, реакционную смесь инкубировали в течение 20 часов при +4°C. Реакцию останавливали путем добавления в раствор TRIS (pH 9.0) до конечной концентрации 1mM. Для удаления не связавшегося биотина и перевода белка в буфер 1xPBS использовали центрифужные концентраторы с диаметром пор 30 кДа Vivaspin 2 (*Sartorius, Германия*), следуя инструкции производителя. Эффективность биотинилирования оценивали методом дот-блот анализа.

### 5.3 Окрашивание клеток:

- а) Окрашивание биотинилированными антигенами проводилось в двух вариантах: 1) последовательная инкубация клеток с биотинилированными антигенами с последующей отмывкой клеток и окрашиванием двумя флуоресцентно-мечеными стрептавидами; 2) окраска предварительно сформированными комплексами аутоантиген-стрептавидин.

В ходе экспериментов с формированием предварительно смешанных комплексов биотинилированных антигенов со стрептавидином использовали антигены, конъюгированные с различным избытком биотина. В случае ТГ -антигены TG-bio1.5 и TG-bio16 и стрептавидины смешивали в молярных соотношениях АГ:стрептавидин 4:1 или 1:1. По результатам окрашивания и анализа методом проточной цитометрии было установлено, что оптимальная чувствительность и специфичность, необходимые для максимальной эффективности детекции целевых клеток, достигаются при двойном позитивном окрашивании комплексами TG-bio16 и стрептавида (PE/Cy5) в соотношении 1:1.

Аналогичный подбор условий окрашивания был проведен для ТРО-bio4. Наиболее эффективным методом окрашивания ТПО положительных В- лимфоцитов являлось использование предварительно сформированных комплексов ТРО-bio4 и стрептавида (PE/Cy5) в молярных соотношениях 1:1.

- б) Учитывая результаты подбора условия окрашивания специфическими антигенами, окраску проб проводили тетрамерным иммунокомплексом со Streptavidin-PE в концентрации 10 нМ и тетрамерным иммунокомплексом со Streptavidin- Cy5 концентрации 50 нМ: инкубировали 15 минут при +4°C и постоянном помешивании.

Для детекции поверхностных лимфоцитарных маркеров использовали флуоресцентные антитела анти-CD45-APC-Cy7 (в разведении 1:300 (Sony, США)), анти-CD19-PE-Cy7 (в разведении 1:1000 (Biolegend, США)) и флуоресцентный маркер мертвых клеток SYTOX<sup>TM</sup>Green (в разведении 1:1000 (Biolegend, США)). Инкубировали дополнительно 30 минут при +4°C в темноте. Далее образцы отмывали 0,5 мл PBS с 2 мМ ЭДТА.

- с) Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью проточного флуориметра ACEA Novocyte (ACEA Biosciences, США).



## **2.4. Источник финансирования**

Грант Российского научного фонда №22-15-00135 «Научное обоснование, разработка и внедрение новых технологий диагностики коморбидных йододефицитных и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в том числе с использованием возможностей искусственного интеллекта» (2022-2024гг.)

## **2.5. Этическая экспертиза**

Протоколы исследований одобрены локальным этическим комитетом ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» МЗ РФ (25 ноября 2021 г., №24 и от 22 декабря 2021 года №26). От всех участников исследования получены информированные согласия на проведение обследования и обработку персональных данных.

## **2.6. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ проведен в программном пакете Statistica 13 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных показателей представлена медианами, первым и третьим квартилями в виде  $Me [Q1; Q3]$ , качественных – абсолютными и относительными частотами. 95% доверительные интервалы (ДИ) для долей рассчитывали методом Клоппера-Пирсона с применением онлайн-калькулятора <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ConfInterval1/>. Сравнение двух независимых групп по количественным данным выполнялось с помощью критерия Манна–Уитни (U-test), более двух независимых групп по количественным признакам – с помощью критерия Краскела-Уоллиса (K-W). По качественным признакам группы были сравнены с применением критерия хи-квадрат Пирсона, с предварительной оценкой его применимости (значение ожидаемых частот более или равно 5), в случае если значение ожидаемых частот было менее 5 использовали поправку Йетса. В случае обнаружения различий при множественном сравнении групп для дальнейшего попарного сравнения использовали post-hoc тесты. Корреляционный анализ был выполнен при помощи критерия Спирмена. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез принят равным 0,05. При множественных сравнениях применялась поправка Бонферрони путем коррекции критического уровня значимости. Рассчитанные уровни значимости в диапазоне от критического до 0,05 описаны в качестве индикаторов статистической тенденции. Для расчета объема выборки в 1 части исследования использовался онлайн-калькулятор <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ

В исследовании приняли участие 605 пациентов, среди которых 540 (89%) женщин и 65 (11%) мужчин, медиана возраста участников составила 49 [41; 61] лет. 580 пациентам (519 (90%) женщин и 61 (10%) мужчина), которые дали согласие на проведение лабораторного обследования, был оценен уровень АТ к ТПО в сыворотке крови. Учитывая ожидаемую распространенность АИТ (7,5% согласно данным мета анализа [3]), необходимый расчетный объем выборки составил 297-667 участников. Имеющийся объем выборки соответствует необходимому минимальную для оценки распространенности с уровнем погрешности  $\pm 2-3\%$ .

Исследований проводилось в двух субъектах Российской Федерации- Тульской области (n=273) и Чеченской Республике (n=307). В группах обследуемых по данным лабораторно-инструментального обследования и данным анкетирования были выявлены региональные различия. В Чеченской Республике более часто наблюдалась атрофическая форма АИТ (общий объем ЩЖ по данным УЗИ  $< 3,0\text{см}^3$ ), ( $p<0,001$ ), при этом средний объем ЩЖ по данным УЗИ в регионах не различался ( $p=0,261$ ). По данным анкетирования в Чеченской Республике меньшее количество участников исследования употребляли йодированную соль ( $p<0,001$ ), а по данным УЗИ ЩЖ отмечалась большая частота признаков узловых образований ( $p<0,001$ ). Полная характеристика участников исследования, которым провели оценку уровня АТ к ТПО в крови представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика участников исследования с известным уровнем АТ к ТПО в сыворотке крови

Признак		Тульская область		Чеченская республика		p
		N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Возраст, лет		273	49 [42; 62]	307	50 [40; 60]	0,565 <sup>1</sup>
Пол	Мужской	273	28 (10,3%)	307	33 (10,8%)	0,847 <sup>2</sup>
	Женский		245 (89,7%)		274 (89,3%)	

ТТГ, мМЕ/л	267	1,052 [0,755; 1,470]	306	1,131 [0,747; 1,639]	0,387 <sup>1</sup>
------------	-----	-------------------------	-----	-------------------------	--------------------

1-Критерий Манна-Уитни; 2-Критерий хи-квадрат Пирсона

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

Продолжение таблицы 2. Характеристика участников исследования с известным уровнем АТ к ТПО в сыворотке крови

Признак		Тульская область		Чеченская Республика		p
		N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
свТ4, пмоль/л		268	12,4 [11,6; 13,3]	307	11,8 [11; 12,8]	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
АТ-ТПО, МЕ/л		273	0,82 [0,34; 4,71]	307	0,40 [0,24; 11,99]	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
Объем ЩЖ, см <sup>3</sup>		273	10,2 [7,9; 13,7]	307	11,0 [7,0; 17,45]	0,261 <sup>1</sup>
УЗИ признаки АИТ		273	48 (17,6%)	307	63 (20,5%)	0,359 <sup>2</sup>
УЗИ признаки узловых образований		273	108 (39,6%)	307	197 (64,2%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
Атрофическая форма АИТ V <sub>общ</sub> < 3,0см <sup>3</sup>		273	8 (2,9%)	307	35 (11,4%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
Увеличенный объем ЩЖ V <sub>женщ</sub> > 18,0см <sup>3</sup> V <sub>муж</sub> > 25,0см <sup>3</sup>		273	30 (11,0%)	307	63 (20,5%)	0,002 <sup>2</sup>
Гипотиреоз (ТТГ ≥ 4,0) мМЕ/л		273	23 (8,4%)	307	31 (10,1%)	0,489 <sup>2</sup>
Данные анкетирования						
Терапия левотироксином натрия		273	20 (7,3%)	304	38 (12,5%)	0,039 <sup>2</sup>
Вредные факторы труда		272	17 (6,3%)	302	15 (5,0%)	0,503 <sup>2</sup>
Употребление I соли	Да, всегда	263	38 (14,5%)	281	29 (10,3%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
	Да, иногда		66 (25,1%)		41 (14,6%)	
	Нет, очень редко		79 (30,0%)		73 (26,0%)	
	Нет, никогда		80 (30,4%)		138 (49,1%)	

Прием БАД	264	11 (4,2%)	279	16 (5,7%)	0,401 <sup>2</sup>
Курение	269	42 (15,6%)	291	11 (3,8%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>

1-Критерий Манна-Уитни; 2-Критерий хи-квадрат Пирсона

*Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.*

Продолжение таблицы 3. Характеристика участников исследования с известным уровнем АТ к ТПО в сыворотке крови

Признак	Тульская область		Чеченская Республика		p
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Роды в течение последних 12 месяцев /период лактации	236	1 (0,4%)	266	59 (22,2%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
Частота деторождения $\geq 3$	245	74 (30,2%)	274	63 (23,0%)	0,063 <sup>2</sup>
Прием КОК	238	17 (7,1%)	271	5 (1,9%)	0,003 <sup>2</sup>

1-Критерий Манна-Уитни; 2-Критерий хи-квадрат Пирсона

*Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.*

Положительные значения АТ к ТПО ( $\geq 5,6$  МЕ/л) выявлены у 143 лиц (25%, 95% ДИ (21%; 28%)) - группа «носителей» АТ к ТПО.

В группе «носителей» АТ к ТПО 141 участнику исследования был оценен уровень ТТГ в крови, у 43 пациентов (30%, 95%ДИ (23%; 39%)) был выявлен гипотиреоз (прием левотироксина натрия в анамнезе и/или ТТГ  $\geq 4$  мМЕ/л), из них 35 пациентов наблюдались у эндокринолога по поводу гипотиреоза в исходе АИТ и принимали терапию левотироксином натрия, а у 8 пациентов впервые выявили ТТГ  $\geq 4$  мМЕ/л.

Всем участникам из группы пациентов с уровнем АТ к ТПО  $\geq 5,6$  МЕ/л проведено УЗИ ЩЖ, из них у 77 (54%, 95% ДИ (45%; 62%)) обследуемых были описаны УЗ - признаки аутоиммунных изменений ЩЖ, а у 65 (46%, 95% ДИ (37%; 54%)) данный признак не был выявлен. Сопутствующие узловые образования ЩЖ по данным УЗИ были выявлены у 73 пациентов (51%, 95% ДИ (43%; 69%)), у 41 пациента (56%, 95% ДИ (44%; 68%)) узловые образования соответствовали EU-TIRADS 2, у 43 пациентов (59%, 95% ДИ (47%; 70%)) были выявлены узловые образования, соответствующие EU-TIRADS 3, у 10 пациентов (14%, 95% ДИ (7%; 24%)) были выявлены узловые образования, соответствующие EU-TIRADS 4 и у 1 пациента (1%, 95% ДИ (0%; 7%)) были выявлены узловые образования, соответствующие EU-TIRADS 5.

Среди участников исследования признаки (много) узлового зоба, по данным УЗ-исследования, выявлены у 305 пациентов (53%, 95% ДИ (48%; 57%)). Распространенность

«носительства» АТ к ТПО среди лиц с признаками (много) узлового зоба составила 24%, 95% ДИ (19%; 29%). А распространенность сочетания (много) узлового зоба и АИТ составила 13%, 95% ДИ (10%; 16%) в обследуемой популяции.

Медиана объема ЩЖ составила 12,0 [8,79; 18,49] см<sup>3</sup>, у 10 лиц объем ЩЖ составил менее 3 см<sup>3</sup>-распространенность атрофических форм АИТ составил 14%, 95% ДИ (3%; 12%). Увеличение ЩЖ ( $V_{\text{женщ}} > 18,0\text{см}^3$ ,  $V_{\text{муж}} > 25,0\text{см}^3$ ) выявлено у 33 пациентов (23%. 95% ДИ (17%; 31%)).

Согласно данным анкетирования, 47% (95% ДИ (38%; 55%)) лиц из группы «носителей» АТ к ТПО не использовали йодированную соль, 3% (95% ДИ (1%; 8%)) принимали БАДы (оценка состава препаратов не проводилась). 41% (95% ДИ (32%; 50%)) пациенток из данной группы имели 3 и более ребенка в анамнезе (многодетность), а у 16% (95% ДИ (10%; 24%)) были роды в течение последних 12 месяцев. Полная характеристика группы представлена в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика группы «носителей» АТ к ТПО

Признак		N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Возраст, лет		143	49 [42; 60]
Пол	Мужской	143	11 (8%)
	Женский		132 (92%)
ТТГ, мМЕ/л		141	1,46 [0,87; 2,74]
свТ4, пмоль/л		140	12,00 [11,10; 13,35]
АТ-ТПО, МЕ/л		143	183,64 [29,71; 539,25]
Объем ЩЖ, см <sup>3</sup>		143	12,00 [8,79; 18,49]
УЗИ признаки АИТ		143	77 (54%)
УЗИ признаки узловых образований		143	73 (51%)
Атрофическая форма АИТ $V_{\text{общ}} < 3,0\text{см}^3$		143	10 (14%)
Увеличенный объем ЩЖ $V_{\text{женщ}} > 18,0\text{см}^3$ $V_{\text{муж}} > 25,0\text{см}^3$		143	33 (23%)
Гипотиреоз (ТТГ $\geq 4,0$ ) мМЕ/л		143	43 (30%)
Данные анкетирования			
Терапия левотироксином натрия		143	35 (25%)
Вредные факторы труда		142	9 (6%)
Употребление I соли	Да, всегда	135	19 (14%)

	Да, иногда		20 (15%)
	Нет, очень редко		33 (24%)
	Нет, никогда		63 (47%)
Прием БАД		133	4 (3%)

Продолжение таблицы 2. Характеристика группы «носителей» АТ к ТПО

Признак	N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Курение	140	12 (9%)
Роды в течение последних 12 месяцев /период лактации	129	21 (16%)
Многодетность	132	54 (41%)
Прием КОК	131	8 (6%)

На основании результатов статистического анализа получены различия групп «носителей» АТ к ТПО и условно здоровых лиц по уровню ТТГ ( $p < 0,001$ ). АТ к ТПО служат маркером развития аутоиммунных реакций, поэтому в группе с повышенным уровнем АТ к ТПО заметна большая вариабельность показателей ТТГ (ТТГ  $< 0,25$  мМЕ/л и  $> 4,0$  мМЕ/л -  $n=38$ , 26,6%; размах вариации составил от 0 мМЕ/л до 45 мМЕ/л), что и обуславливает выявленные различия.

Также были выявлены статистически значимые различия по данным УЗ-исследования ЩЖ: признаки аутоиммунных изменений наблюдались в группе с повышенными показателями АТ к ТПО в 54,2%, (95% ДИ (43%; 60%)), что значимо чаще, чем в группе с нормальными показателями АТ к ТПО ( $p < 0,001$ ). Различий по уровню свТ4, объему ЩЖ между пациентами данных групп не выявлено (Таблица 3).

Таблица 3. Сравнение группы «носителей» АТ к ТПО и лиц с АТ к ТПО -

Признак		АТ к ТПО $\geq 5,6$ МЕ/л		АТ к ТПО $< 5,6$ МЕ/л		p
		N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Возраст, лет		143	49 [42; 60]	437	50 [40; 61]	0,778 <sup>1</sup>
Пол	Мужской	143	11 (8%)	437	50 (11%)	0,205 <sup>2</sup>
	Женский		132 (92%)		387 (89%)	
ТТГ, мМЕ/л		141	1,46 [0,87; 2,74]	432	1,04 [0,74; 1,40]	<b><math>&lt; 0,001</math></b> <sup>1</sup>
свТ4, пмоль/л		140	12,0 [11,1; 13,35]	435	12,2 [11,3; 13,0]	0,527 <sup>1</sup>

1 – критерий Манна-Уитни

2 – критерий хи-квадрат Пирсона

Примечание: поправка Бонферрони  $0,05/9 = 0,006$

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

Продолжение таблицы 3. Сравнение группы «носителей» АТ к ТПО и лиц с АТ к ТПО -

Признак	АТ к ТПО $\geq 5,6$ МЕ/л		АТ к ТПО $< 5,6$ МЕ/л		p
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Объем ЩЖ	143	12,00 [8,79; 18,49]	437	10,20 [7,45; 14,97]	0,006 <sup>1</sup>
УЗИ признаки АИТ	143	77 (54%)	437	34 (8%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
УЗИ признаки узловых образований	143	73 (51%)	437	232 (53%)	0,649 <sup>2</sup>
Гипотиреоз	143	43 (30%)	437	10 (2%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
Частота деторождения $\geq 3$	132	54 (41%)	387	83 (22%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>

1 – критерий Манна-Уитни

2 – критерий хи-квадрат Пирсона

Примечание: поправка Бонферрони  $0,05/9 = 0,006$

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

Для оценки взаимосвязи уровня АТ к ТПО и факторов, ассоциированных с АИТ лица из группы «носители» АТ к ТПО были разделены на группы по наличию или отсутствию исследуемых факторов. Взаимосвязей между уровнем АТ к ТПО и наличием узловых образований ЩЖ, родов в течение последних 12 месяцев или приемом КОК или использованием йодированной соли или БАДов в исследуемых группах не выявлено (таблица 4).

Таблица 4. Взаимосвязь наличия признаков с уровнем АТ к ТПО в группе «носителей» АТ к ТПО

Признак	Наличие признака		Отсутствие признака		p, U-test
	N	АТ к ТПО, МЕ/мл Me [Q1; Q3]	N	АТ к ТПО, МЕ/мл Me [Q1; Q3]	
Узловые образования по данным УЗИ	73	183,64 [25,87; 426,97]	70	181,085 [34,45; 591,61]	0,485

Курение	12	150,19 [35,04; 924,50]	128	184,285 [29,375; 507,37]	0,780
---------	----	---------------------------	-----	--------------------------------	-------

Примечание: поправка Бонферрони  $0,05/9 = 0,006$

Продолжение таблицы 4. Взаимосвязь наличия признаков с уровнем АТ к ТПО в группе «носителей» АТ к ТПО

Признак	Наличие признака		Отсутствие признака		p, U-test
	N	АТ к ТПО, МЕ/мл Me [Q1; Q3]	N	АТ к ТПО, МЕ/мл Me [Q1; Q3]	
Прием БАД	4	334,845 [207,61; 629,135]	129	184,93 [32,50; 539,25]	0,360
Роды за последние 12 месяцев	21	91,18 [26,08; 679,21]	108	219,875 [38,665; 552,15]	0,639
Частота деторождения $\geq 3$	54	316,265 [72,55; 652,77]	78	108,585 [25,87; 384,86]	<b>0,037</b>
Прием КОК	8	56,46 [29,87; 232,265]	123	198,00 [32,50; 591,61]	0,206
Употребление йодированной соли	39	162,86 [25,87; 565,05]	96	197,65 [41,405; 507,37]	0,534
Объем ЩЖ ( $< 3\text{см}^3$ )	10	105,85 [36,96; 197,30]	133	187,60 [29,71; 565,05]	0,431
Объем ЩЖ ( $>18\text{ см}^3$ у женщин и $>25\text{ см}^3$ у мужчин)	33	267,47 [27,95; 539,25]	110	163,075 [32,50; 537,27]	0,634

Примечание: поправка Бонферрони  $0,05/9 = 0,006$

Статистически значимые показатели и показатели на уровне статистических тенденции выделены жирным шрифтом.

Статистический анализ выявил очень слабую положительную корреляцию между уровнем ТТГ и уровнем АТ-ТПО в сыворотке крови среди «носителей» АТ-ТПО ( $p=0,006$ ;



коэффициент корреляции  $R=0,23$ ), (таблица 5, рисунок 5). Обнаруженная взаимосвязь, вероятно, объясняется включением в исследуемую группу пациентов с гипотиреозом различной степени тяжести ( $n=43$  (30%)), в том числе с декомпенсированными формами (уровень ТТГ  $> 4$  мМЕ/л), развившимся на фоне АИТ. Данное обстоятельство могло привести к искажению корреляционных взаимосвязей между изучаемыми параметрами.

Таблица 5. Корреляция уровня АТ к ТПО и уровня ТТГ и объема ЩЖ в группе «носителей» АТ к ТПО

Признак 1	Признак 2	N	$\rho$ , Spearman	R
ТТГ, мМЕ/л	АТ-ТПО, МЕ/мл	141	<b>0,006</b>	0,23
Объем ЩЖ	АТ-ТПО, МЕ/мл	143	0,421	-

Поправка Бонферрони:  $0,05/2 = 0,025$

Статистически значимые корреляции выделены жирным шрифтом.

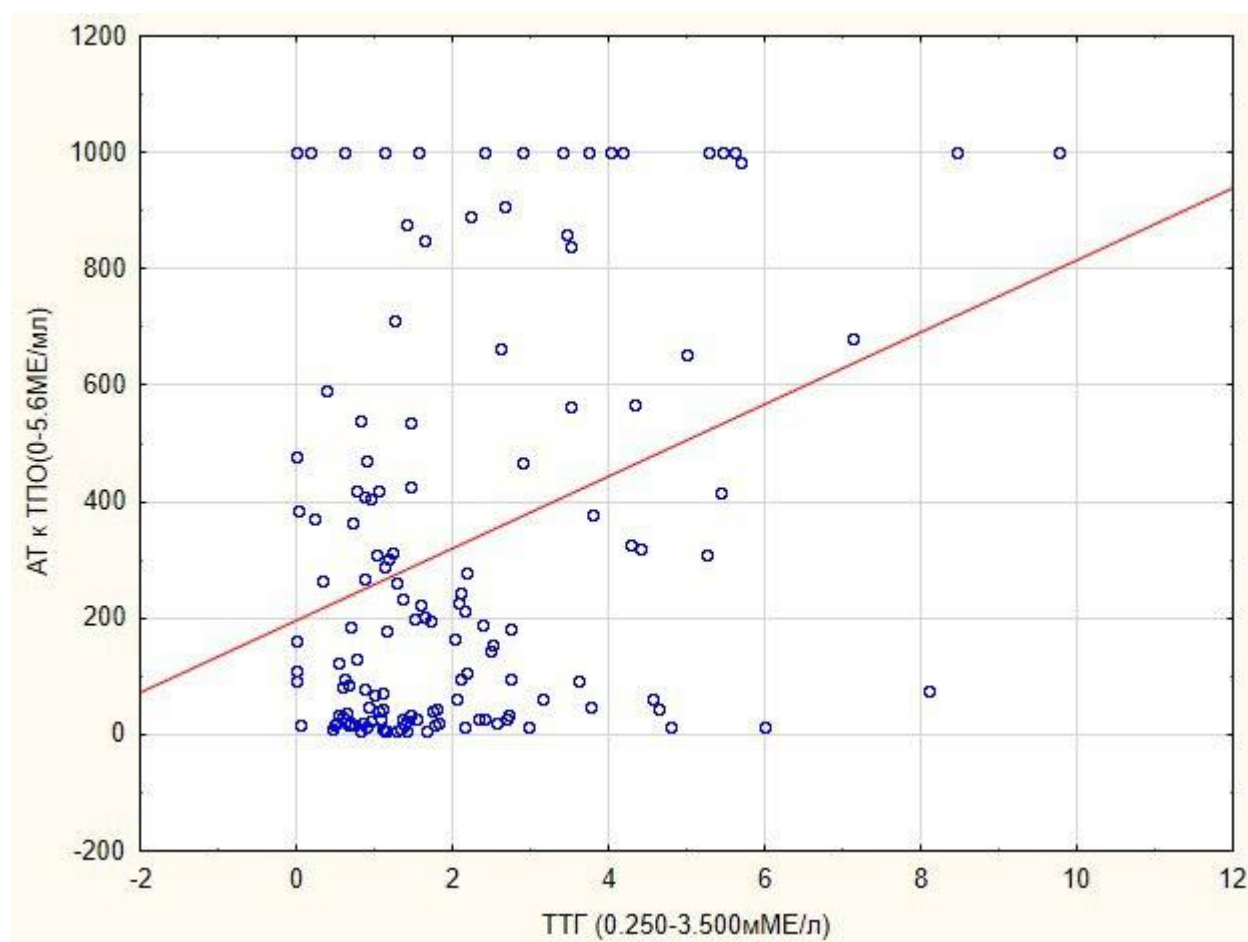


Рисунок 5. Корреляция уровня АТ к ТПО и уровня ТТГ и объема ЩЖ в группе «носителей» АТ к ТПО ( $n=143$ )

Среди участниц исследования, у которых был оценен уровень АТ к ТПО, 137 женщины имели 3 и более детей (26%, 95% ДИ (23%; 30%)). Полная характеристика группы представлена в таблице 6.

Таблица 6. Характеристика женщин с частотой деторождения 3 и более

Признак		N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Возраст, лет		137	52 [43; 63]
ТТГ, мМЕ/л		136	1,2875 [0,7875; 1,922]
свТ4, пмоль/л		135	12,2 [11,2; 13,3]
АТ-ТПО, МЕ/л		137	1,82 [0,35; 163,29]
Объем ЩЖ, см <sup>3</sup>		137	9,7 [7,3; 14,2]
УЗИ признаки АИТ		137	39 (28,5%)
УЗИ признаки узловых образований		137	70 (51,1%)
Атрофическая форма АИТ $V_{\text{общ}} < 3,0 \text{ см}^3$		137	11 (8,0%)
Увеличенный объем ЩЖ $V_{\text{женщ}} > 18,0 \text{ см}^3$		137	22 (16,1%)
Гипотиреоз (ТТГ $\geq 4,0$ ) мМЕ/л		137	24 (17,5%)
Данные анкетирования			
Терапия левотироксином натрия		137	24 (17,5%)
Вредные факторы труда		135	7 (5,2%)
Употребление I соли	Да, всегда	130	18 (13,8%)
	Да, иногда		25 (19,2%)
	Нет, очень редко		37 (28,5%)
	Нет, никогда		50 (38,5%)
Прием БАД		131	10 (7,6%)
Курение		133	9 (6,8%)
Роды в течение последних 12 месяцев /период лактации		133	14 (10,5%)
Прием КОК		135	8 (5,9%)

Распространенность АИТ среди женщин с тремя и более детьми: в группе «носителей» АТ к ТПО 54 женщины (41%, 95% ДИ (32%; 50%)). Этот показатель значимо превышает аналогичный у группы лиц с нормальными значениями АТ к ТПО в крови (83 пациентки (21,45%, 95% ДИ (15%; 23%)), ( $p < 0,001$ ), (таблица 3). Было установлено, что показатель АТ к ТПО в группе пациенток «носителей» АТ к ТПО выше у многодетных женщин в сравнении с немногочетными пациентками, однако данное наблюдение соответствует статистической тенденции ( $p=0,037$ ), таблица 4. Полная характеристика группы женщин «носительниц» АТ к ТПО с частотой деторождения 3 и более представлен в таблице 7.

Таблица 7. Характеристика группы женщин с частотой деторождения 3 и более и "носительством" АТ к ТПО

Признак	N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Возраст, лет	54	51,5 [43; 60]
ТТГ, мМЕ/л	53	2,083 [1,255; 3,525]
свТ4, пмоль/л	53	11,6 [10,8; 12,9]
АТ-ТПО, МЕ/л	54	316,265 [72,55; 652,77]
Объем ЩЖ, см <sup>3</sup>	54	10,0 [7,3; 15,5]
УЗИ признаки АИТ	54	28 (51,9%)
УЗИ признаки узловых образований	54	27 (50,0%)
Атрофическая форма АИТ $V_{\text{общ}} < 3,0 \text{ см}^3$	54	7 (13,0%)
Увеличенный объем ЩЖ $V_{\text{женщ}} > 18,0 \text{ см}^3$	54	10 (18,5%)
Гипотиреоз (ТТГ $\geq 4,0$ ) мМЕ/л	54	21 (38,9%)

Продолжение таблицы 7. Характеристика группы женщин с частотой деторождения 3 и более и "носительством" АТ к ТПО

Признак		N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Данные анкетирования			
Терапия левотироксином натрия		54	16 (29,6%)
Вредные факторы труда		54	2 (3,7%)
Употребление I соли	Да, всегда	52	6 (11,5%)
	Да, иногда		6 (11,5%)
	Нет, очень редко		13 (25%)
	Нет, никогда		27 (51,9%)
Прием БАД		52	2 (3,7%)
Курение		53	2 (3,7%)
Роды в течение последних 12 месяцев /период лактации		52	8 (15,4%)
Прием КОК		53	5 (9,4%)

При анализе взаимосвязи многодетности и наличия повышенного уровня АТ к ТПО были выявлены региональные различия: у 50% женщин (95% ДИ (40%; 63%)) - «носительниц» АТ к ТПО в Чеченской Республике при анкетировании получены данные о наличии трех и более детей, что значимо выше по сравнению с данным показателем в Тульской области (25%, 95% ДИ (15%;39%)), ( $p=0,005$ ), таблица 8.

Таблица 8. Сравнение распространенности частоты деторождения более 3х в Тульской области и Чеченской Республике в группе «носителей» АТ к ТПО

Признак	АТ к ТПО $\geq 5,6$ МЕ/л				p
	Тульская область		Чеченская Республика		
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Частота деторождения $\geq 3$	59	15 (25%)	78	39 (50%)	<b>0,005<sup>1</sup></b>
Возраст, лет	59	52 [43,5; 63,5]	78	47 [40,5; 57,5]	0,099 <sup>2</sup>

1 – критерий хи-квадрат Пирсона

2 – критерий Манна-Уитни

Примечание: поправка Бонферрони  $0,05/2 = 0,025$

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

Различий по количеству многодетных женщин в обследуемых регионах не выявлено ( $p=0,063$ ), таблица 9.

Таблица 9. Сравнение распространенности частоты деторождения более 3х в Тульской области и Чеченской Республике

Группы	Тульская область		Чеченская Республика		p
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Частота деторождения $\geq 3$	245	74 (30,2%)	274	63 (23,0%)	0,063 <sup>1</sup>
Частота деторождения < 3		171 (69,8%)		211 (77,0%)	
Возраст, лет	255	50 [42; 63]	285	49 [40; 60]	0,281 <sup>2</sup>

1 – критерий хи-квадрат Пирсона

2 – критерий Манна-Уитни

Региональных различий в группе женщин с 3 и более детьми среди «носительниц» АТ к ТПО не выявлено, таблица 10.

Таблица 10. Сравнение "носительниц" АТ к ТПО с 3 и более детьми в Тульской области и Чеченской Республике

Признак		Тульская область		Чеченская Республика		p
		N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Возраст, лет		15	55 [45; 65]	39	49 [41; 58]	0,145 <sup>1</sup>
ТТГ, мМЕ/л		14	1,536 [1,100; 2,419]	39	2,489 [1,294; 4,284]	0,144 <sup>1</sup>
свТ4, пмоль/л		14	12,35 [11,6; 14,2]	39	11,3 [10,0; 12,9]	0,063 <sup>1</sup>
АТ-ТПО, МЕ/л		15	184,93 [30,80; 712,83]	39	327,16 [80,81; 652,77]	0,992 <sup>1</sup>
Объем ЩЖ, см <sup>3</sup>		15	9,7 [7,4; 13,2]	39	10,7 [6,7; 18,9]	0,325 <sup>1</sup>
УЗИ признаки АИТ		15	7 (46,7%)	39	21 (53,9%)	0,636 <sup>2</sup>
УЗИ признаки узловых образований		15	6 (40,0%)	39	21 (53,9%)	0,362 <sup>2</sup>
Атрофическая форма АИТ V <sub>общ</sub> < 3,0см <sup>3</sup>		15	2 (13,3%)	39	5 (12,8%)	1,000 <sup>3</sup>
Увеличенный объем ЩЖ V <sub>женщ</sub> > 18,0см <sup>3</sup>		15	0 (0%)	39	10 (25,6%)	0,075 <sup>3</sup>
Гипотиреоз (ТТГ ≥ 4,0) мМЕ/л		15	4 (26,7%)	39	15 (38,5%)	0,416 <sup>2</sup>
Данные анкетирования						
Терапия левотироксином натрия		15	4 (26,7%)	39	12 (30,8%)	1,000 <sup>3</sup>
Вредные факторы труда		15	1 (6,7%)	39	1 (2,6%)	1,000 <sup>3</sup>
Употребление I соли	Да, всегда	14	1 (7,1%)	38	5 (13,2%)	0,906 <sup>2</sup>
	Да, иногда		2 (14,3%)		4 (10,5%)	
	Нет, очень редко		4 (28,6%)		9 (23,7%)	
	Нет, никогда		7 (50,0%)		20 (52,6%)	
Прием БАД		15	1 (6,7%)	37	1 (2,7%)	1,000 <sup>3</sup>

1 – критерий хи-квадрат Пирсона; 2 – критерий Манна-Уитни;

3 – критерий хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса

Продолжение таблица 10. Сравнение "носительниц" АТ к ТПО с 3 и более детьми в Тульской области и Чеченской Республике

Признак	Тульская область		Чеченская Республика		p
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Курение	15	2 (13,3%)	38	0 (0%)	0,135 <sup>3</sup>
Роды в течение последних 12 месяцев /период лактации	13	0 (0%)	39	8 (20,5%)	0,183 <sup>3</sup>
Прием КОК	14	4 (28,6%)	39	1 (2,6%)	0,020 <sup>3</sup>

3 – критерий хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса

Проведен анализ коморбидности АИТ и (много) узлового зоба среди женщин с высокой частотой деторождения ( $\geq 3$ ). Выявлена взаимосвязь высокой частоты деторождения, наличия повышенного уровня АТ к ТПО и (много) узлового зоба ( $p=0,012$ ), таблица 11.

Таблица 11. Сравнение коморбидности АИТ и (много) узлового зоба среди женщин с высокой частотой деторождения

Группы	АТ к ТПО $\geq 5,6$ МЕ/л И наличие узлового зоба		АТ к ТПО $< 5,6$ МЕ/л И отсутствие узлового зоба		p
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	
Частота деторождения $\geq 3$	67	27 (40%)	174	40 (23%)	<b>0,007<sup>1</sup></b>
Частота деторождения $< 3$		40 (28%)		134 (77%)	
Возраст, лет	67	54 [43; 64]	174	48 [38; 56]	<b>0,006<sup>2</sup></b>

1 – критерий хи-квадрат Пирсона

2 – критерий Манна-Уитни

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

В рамках исследования выявлено 68 пациентов с гипотиреозом (12%, 95% ДИ (9%; 15%)) среди всех участников исследования, однако лишь 57 пациентов (84%, 95% ДИ (73%; 92%)) принимали терапию левотироксином натрия. У 8 из 11 пациентов, не принимающих

терапию левотироксином натрия, выявлен повышенный уровень АТ к ТПО, у других гипотиреоз возник в результате оперативного лечения на ЩЖ. Среди пациентов с гипотиреозом повышенный уровень АТ к ТПО был выявлен у 42 пациентов (62%, 95% ДИ (49%; 73%)).

По результатам проведенного обследования в Тульской области и Чеченской Республике сформированы и запатентованы 2 базы данных: «Результаты антропометрического, гормонального и иммунологического обследований населения Чеченской Республики, как йододефицитного региона» № 2023624082 от 21.11.2023 и «Результаты антропометрического, гормонального, иммунологического и инструментального обследований населения Тульской области, как йододефицитного региона» № 2023624104 от 22.11.2023.

Суммируя представленные результаты, установлено, что распространённость «носительства» антител к тиреопероксидазе у лиц старше 18 лет, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита, составила 25%, 95% ДИ (21%; 28%). В то же время, распространённость «носительства» антител к тиреопероксидазе у лиц старше 18 лет, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита, составила 25%, 95% ДИ (21%; 28%). Анализ данных показал наличие ассоциации между высокой частотой деторождения ( $\geq 3$  детей), наличием «носительства» антител к тиреопероксидазе. Статистической связи между наличием антител к тиреопероксидазе и узловым (многоузловым) зобом не получено.



### 3.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ

Для оценки клеточного состава крови пациентов с АИТ проведено обследование 123 пациентов, разделенных на 4 группы: «носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ (n=27), медиана возраста составила 29 лет [26; 40,5]; пациенты с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ (n=46), медиана возраста составила 42 года [35; 52]; пациенты с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС 2 и 3 типов (n=30), медиана возраста составила 39 лет [34; 47]; и контрольная группа (n=20), медиана возраста составила 31 год [28; 41]. Критерии включения и исключения обеспечивали соответствие изучаемых групп целевой популяции (пациенты с аутоиммунным тиреоидитом), в каждой из них преобладали женщины n=24 (89%), n=40 (87%), n=28(93%), n=16 (80%) соответственно, что соответствовало литературным данным о преобладании распространенности аутоиммунных заболеваний ЩЖ среди женщин. В группах пациентов с нарушенным аутоиммунитетом ЩЖ статистически значимых различий по уровню АТ к ТГ, АТ к ТПО и клиническим характеристикам не выявлено (таблица 9). Основной задачей исследования являлся анализ взаимосвязи между показателями, а не оценка их популяционной распространенности. Следует учитывать, что в связи с необходимостью исключения влияния внешних факторов на содержание Т- и В- лимфоцитов в крови были применены строгие критерии включения и исключения, что могло повлиять на силу выявленных ассоциаций.

Таблица 9. Клиническая характеристика исследуемых групп

Признак	«носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ (1)		АИТ (2)		АИТ в составе АПС (3)		Контрольная группа (4)		«носители» АТ vs контрольная группа, р	АИТ vs контрольная группа, р	АИТ в составе АПС vs контрольная группа, р
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)			
Возраст, лет	27	29 [26; 40,5]	46	42 [35; 52]	30	39 [34; 47]	20	31 [28; 41]	0,020	0,576	0,070
Женский пол	27	24 (89%)	46	40 (87%)	30	28 (93%)	20	16 (80%)	0,666	0,726	0,329
ТТГ, мМЕ/л	27	1,595 [1,328; 2,373]	46	2,474 [1,787; 4,906]	30	2,21 [1,17; 3,96]	20	1,336 [0,851; 1,805]	<b>0,001</b>	0,038	0,014
АТ к ТГ, МЕ/л	27	213,71 [35,18; 315,50]	46	127,90 [46,73; 240,80]	30	85,93 [23,90; 227,60]	20	14,66 [12,555; 17,155]	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
АТ к ТПО, МЕ/л	27	205,16 [83,85; 489,87]	46	392,145 [122,13; 1000,00]	30	220,045 [13,54; 560,12]	20	0,875 [0,3; 1,3495]	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	27	23,9 [21,3; 29,3]	46	26,6 [21,0; 29,7]	30	23,1 [20,9; 25,7]	20	24,6 [21,5; 29,4]	0,621	0,689	0,488
Прием БАД	27	5 (19%)	46	11 (24%)	30	4 (13%)	20	2 (10%)	0,845	0,505	1,000

Поправка Бонферрони:  $p=0,05/7=0,007$

Статистически значимые показатели выделены жирным шрифтом.

### 3.2.1. Содержание Т- лимфоцитов

Общее содержание  $CD4^+$ Т- лимфоцитов (Т-хелперы) и  $CD8^+$ Т- лимфоцитов (Т-киллеры) *in vivo* от общего количества Т- лимфоцитов в группах «носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ, АИТ и АИТ в составе АПС составило 64,8% [55,8; 70,85], 59,7% [55,3; 63,1], 63,0% [60,1; 69,4] и 31,7% [26,25; 39,85], 33,65% [30,25; 39,45], 32,5% [28,4; 36,8]. Различий в содержании клеток не выявлено (таблица 10). Однако наблюдается тенденция к более низкому содержанию Т-хелперов в крови у пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ в сравнении с условно здоровыми лицами ( $p=0,030$ ) и соответственно отклонение соотношения  $CD4^+/CD8^+$  лимфоцитов в сторону уменьшения содержания  $CD4^+$  клеток: 2,28 [1,69; 2,52] у условно здоровых и 1,75 [1,36; 2,04] у пациентов с АИТ, ( $p=0,030$ ). Данная картина наблюдается только у пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ, и отсутствует в группах пациентов с АИТ в составе АПС и у «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ.

Статистически значимых различий в содержании  $IF\gamma$ - $CD4^+/CD3^+$  Th1 и IL-4- $CD4^+/CD3^+$  Th2 и соответственно в соотношении Th1/ Th2 в исследуемых группах не выявлено (таблица 10).

В группе пациентов с АИТ в составе АПС выявлена тенденция к повышенному содержанию Th17- лимфоцитов 3,55% [3,1; 4,9], в сравнении с контрольной группой 1,75 % [0,6; 2,85], ( $p=0,040$ ) и в сравнении с «носителями» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ 1,7 % [0,8; 2,7], ( $p=0,013$ ).

Учитывая тенденции к повышению содержания Th17- лимфоцитов в данных группах, выявлено повышение соотношения Th17/Treg, однако только при сравнении групп АИТ в составе АПС и контрольной группы – 0,95 [0,8; 1,3] и 0,3 [0,1; 0,5], ( $p=0,013$ ).

При сравнении показателей Т-клеточного звена в группе «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ и групп с развившимся гипотиреозом в исходе АИТ (как изолированного, так и в составе АПС) различий в содержании клеток не выявлено. Содержание Т-клеточного звена представлено в таблице 10.

Таблица 10. Содержание Т- лимфоцитов

Группа Признак	АИТ		АИТ vs Контр ольна я групп а	АИТ vs «носите ли» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ	«носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ		«носите ли» АТ vs Контро льная группа	АИТ в составе АПС		АИТ в составе АПС vs Контро льная группа	АИТ в составе АПС vs «носите ли» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ	Контрольная группа	
	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]
CD4 % от Т кл	16	59,7 [55,3; 63,1]	<b>0,030</b>	0,274	8	64,8 [55,8; 70,85]	0,897	10	63 [60,1; 69,4]	0,871	0,965	6	65,6 [59,6; 66,9]
CD8 % от Т кл	16	33,65 [30,25; 39,45]	0,162	0,576	8	31,7 [26,25; 39,85]	0,747	10	32,5 [28,4; 36,8]	0,551	0,965	6	28,9 [26,5; 34,7]
CD4/CD8	16	1,75 [1,36; 2,04]	<b>0,030</b>	0,559	8	2,06 [1,44; 2,70]	0,949	10	1,95 [1,63; 2,44]	0,625	0,965	6	2,28 [1,69; 2,52]

IFN $\gamma$ % CD4CD3 <sup>от</sup> (Th1)	16	17,9 [10,25; 26,05]	0,887	0,920	8	14,3 [7,4; 34,2]	0,925	10	17,1 [6,4; 31,6]	0,944	0,961	6	16,6 [10,0; 22,65]
IL-4 % CD4CD3 <sup>от</sup> (Th2)	16	0,65 [0,25; 1,05]	0,433	0,947	8	0,6 [0,2; 1,5]	0,685	10	0,6 [0,1; 1,1]	0,426	0,922	6	0,7 [0,4; 1,5]
Th1/Th2	16	38,0 [10,5; 84,0]	0,295	0,785	8	26,0 [9,25; 57,0]	0,648	10	24,2 [12,7; 58,375]	0,426	0,957	6	9,4 [5,8; 63,75]
IL-17 % CD4CD3 <sup>от</sup> (Th <sub>17</sub> )	16	2,5 [1,7; 5,0]	0,238	0,193	8	1,7 [0,8; 2,7]	1,000	10	3,55 [3,1; 4,9]	<b>0,040</b>	<b>0,013</b>	6	1,75 [0,6; 2,85]
CD25FoxP 3 % CD4CD3 <sup>от</sup> (Treg)	16	3,4 [1,6; 4,5]	<b>0,013</b>	0,102	8	1,8 [1,4; 2,2]	<b>0,015</b>	10	4,35 [3,3; 5,7]	0,270	0,071	6	5,7 [4,8; 5,8]
Th17/Treg	16	1,1 [0,3; 1,9]	0,053	0,973	8	1,2 [0,4; 1,6]	0,108	10	0,95 [0,8; 1,3]	<b>0,013</b>	0,961	6	0,3 [0,1; 0,5]

Поправка Бонферрони:  $p=0,05/13=0,004$ . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.

### 3.2.2. Содержание Т и В-регуляторных лимфоцитов

Общее содержание В- регуляторных лимфоцитов (CD19+38hi/24hiBreg) от общего количества В- лимфоцитов в группе пациентов «носителей» АТ к ТПО без нарушенной функции ЩЖ составило 4,65% [2,6; 5,6], у пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ составило 4,1% [2,0; 5,6], а у пациентов с АИТ в составе АПС составило 2,45% [1,6; 5,45]. Данный показатель снижен у пациентов с АИТ в составе АПС, в том числе и при сравнении с контрольной группой и составил 4,7% [3,8; 6,8], однако статистической значимости в различии не выявлено ( $p=0,019$ ). Учитывая тенденции к снижению содержания В регуляторных клеток у пациентов с АПС в сравнении с контрольной группой и отсутствием тенденций к снижению в группе пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ, можно предположить существенное влияние сопутствующих аутоиммунных патологий на В регуляторное звено иммунной системы.

Во всех группах пациентов с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ определено сниженное содержание IL-10 продуцирующих Breg (B10- лимфоциты) в сравнении с контрольной группой, однако статистически значимые различия выявлены в группе пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС ( $p < 0,001$ ) (таблица 11).

Общее содержание В- регуляторных клеток памяти (CD24hiCD27<sup>+</sup>) *in vivo* (% от количества В- лимфоцитов) и IL-10 продуцирующих В- регуляторных клеток памяти *in vitro* у пациентов с нарушением аутоиммунитета и в группе контроля представлено в таблицах 11,12. Тенденция к более низкому содержанию CD24hiCD27<sup>+</sup> выявлена во всех группах пациентов с нарушением аутоиммунитета ЩЖ в сравнении с контрольной группой, однако при применении поправки Бонферрони снижение было статистически не значимым ( $p=0,043$ ;  $p=0,050$ ;  $p=0,017$ ). При оценке содержания IL-10 продуцирующих В- клеток памяти различий выявлено не было. При сравнении пациентов с АИТ (изолированным и в составе АСП) и «носителей» АТ к ТПО значимых различий в содержании В-клеток памяти, а также в количестве IL-10 продуцирующих В-клеток памяти, выявлено не было.

Таблица 11. Содержание Т- и В- регуляторных лимфоцитов в исследуемых группах

Группа	АИТ		АИТ vs Контроль ная группа	АИТ vs «носители» АТ	«носители» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ		«носи тели» АТ vs Контр ольна я групп а	АИТ в составе АПС		АИТ в составе АПС vs Контроль ная группа	АИТ в составе АПС vs Носители АТ	Контрольная группа	
	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]	p,U- test	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]
CD19 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> hi/24 <sup>+</sup> hi Breg in vitro % от В- лимфоци тов	40	4,1 [2,0; 5,6]	0,145	0,776	27	4,65 [2,6; 5,6]	0,417	24	2,45 [1,6; 5,45]	<b>0,019</b>	0,731	20	4,7 [3,8; 6,8]
В10- лимфоци ты % от Breg	40	15 [7,2; 26,7]	<b>0,004</b>	0,343	27	16,7 [3,1; 27,1]	<b>0,016</b>	24	8,5 [2,7; 16,1]	<b>&lt;0,001</b>	0,987	11	28,4 [19,4; 44,8]
CD25Fox P3 % от CD4CD3 (Treg)	16	3,4 [1,6; 4,5]	<b>0,013</b>	0,102	8	1,8 [1,4; 2,2]	<b>0,015</b>	10	4,35 [3,3; 5,7]	0,270	0,071	6	5,7 [4,8; 5,8]

Поправка Бонферрони:  $p=0,05/13=0,004$ . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.

Таблица 12. Содержание В- регуляторных клеток памяти в исследуемых группах

Группа Признак	АИТ		АИТ Vs Контр ольна я групп а	АИТ Vs «носи тели» АТ к ТПО	Носители АТ		«носи тели» АТ vs Контро льная группа	АИТ в составе АПС		АИТ в составе АПС vs Контро льная группа	АИТ в составе АПС Vs «носител и» АТ к ТПО	Контрольная группа	
	N	Me [Q1; Q3]	p,U- test	p,U- test	N	Me [Q1; Q3],	p,U-test	N	Me [Q1; Q3]	p,U-test	p,U-test	N	Me [Q1; Q3]
В клетки памяти CD24hiCD27+ % от В- лимфоцитов	20	1,65 [0,75; 4,55]	<b>0,050</b>	0,387	8	2,8 [2,2; 4,45]	<b>0,043</b>	10	3,05 [1,3; 4,0]	<b>0,017</b>	0,894	7	7,7 [4,3; 9,5]
IL-10 продуцирующие В клетки памяти % от CD24hiCD27+	20	40,5 [31,45; 58,2]	0,678	0,859	8	45,25 [33,15; 49,05]	0,603	10	51,8 [34,3; 56,2]	0,961	0,198	7	51,4 [30,1; 59,8]

Поправка Бонферрони:  $p=0,05/13=0,004$  . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.



Во всех исследуемых группах выявлено снижение содержания В-клеток памяти ( $CD24^{hi}CD27^{+}$ ) при добавлении неспецифического активатора, таблицы 13,14. Однако, при анализе функциональных свойств IL-10 продуцирующих В- клеток памяти выявлено усиление индукции под действием неспецифического активатора в группе пациентов с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ. Данные различия были статистически значимы только в группе пациентов с АИТ в составе АПС ( $p=0,002$ ). В контрольной группе изменений в содержании данных клеток под действием активатора и без не выявлено.

По результатам исследования выявлено сниженное содержание Т-регуляторного звена ( $CD25^{+}FoxP3^{+}Treg$ ) у пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ 3,4% [1,6; 4,5], ( $p=0,013$ ) и у «носителей» АТ к ТПО 1,8% [1,4; 2,2], ( $p=0,015$ ) в сравнении с контрольной группой 5,7% [4,8; 5,8]. Однако, при применении статистических методов анализа статистическая значимость отсутствовала.

Таблица 13. Оценка степени индукции Т- и В- лимфоцитов в группе пациентов с АИТ и «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ

Группа  Признак	АИТ					Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ				
	Без активатора		С активатором			Без активатора		С активатором		
	N	Me [Q1; Q3]	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]	N	Me [Q1; Q3]	p, U- test
В клетки памяти CD24hiCD27+ % от В- лимфоцитов	20	24,6 [14,85; 33,5]	20	1,65 [0,75; 4,55]	<b>&lt;0,001</b>	8	30,95 [22,55; 38,4]	8	2,8 [2,2; 4,45]	<b>0,001</b>
В клетки памяти IL-10+ % от CD24hiCD27+	20	21,2 [14,7; 38,45]	20	40,5 [31,45; 58,2]	<b>0,011</b>	8	30,55 [20,5; 44,8]	8	45,25 [33,15; 49,05]	0,074
IFN $\gamma$ % от CD4CD3 (Th1)	16	2,5 [0,15; 9,5]	16	17,9 [10,25; 26,05]	<b>0,001</b>	8	2,3 [2,0; 10,3]	8	14,3 [7,4; 34,2]	0,074
Т- лимфоциты IL-4+ % от CD4CD3Th2	16	0,05 [0,0; 0,1]	16	0,65 [0,25; 1,05]	<b>&lt;0,001</b>	8	0,1 [0,0; 0,1]	8	0,6 [0,2; 1,5]	0,055

Поправка Бонферрони: 0,05/4=0,01. *Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.*

Таблица 14. Оценка степени индукции Т- и В- лимфоцитов в группе пациентов с АИТ в составе АПС и контрольной группе

Группа Признак	АИТ в составе АПС					Контрольная группа				
	Без активатора		С активатором			Без активатора		С активатором		
	N	Me [Q1; Q3]	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test	N	Me [Q1; Q3]	N	Me [Q1; Q3]	p, U-test
В клетки памяти CD24hiCD27+ % от В клеток	10	19,65 [16,2; 36,4]	10	3,05 [1,3; 4,0]	<b>0,001</b>	7	39,9 [28,6; 46,3]	7	7,7 [4,3; 9,5]	<b>0,002</b>
В клетки памяти IL-10+ % от CD24hiCD27+	10	18,75 [14,6; 30,9]	10	51,8 [34,3; 56,2]	<b>0,002</b>	7	53,2 [29,3; 60,5]	7	51,4 [30,1; 59,8]	1,000
IFN $\gamma$ % от CD4CD3 (Th1)	10	0,85 [0,2; 2,3]	10	17,1 [6,4; 31,6]	<b>0,002</b>	6	4,4 [1,55; 15,65]	6	16,6 [10,0; 22,65]	0,312
Т- лимфоциты IL-4+ % от CD4CD3 Th2	10	0,0 [0,0; 0,1]	10	0,6 [0,1; 1,1]	<b>0,002</b>	6	0,4 [0,1; 0,6]	6	0,7 [0,4; 1,5]	0,251

Поправка Бонферрони: 0,05/4=0,01. . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.

С целью уточнения ассоциации выраженности нарушения иммунологической толерантности и степени снижения Breg, проведена оценка содержания данных клеток у пациентов с АПС с разным числом сопутствующих АИЗ (Таблица 15). Проведение сравнительного анализа групп невозможно вследствие их малочисленности, что приводит к недостаточной статистической мощности для получения достоверных результатов.

Таблица 15. Содержание регуляторных В- лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* у пациентов с АПС

Группа  Признак	Количество аутоиммунных заболеваний						
	2		3			4	
	АИТ+ СД1 N=20	АИТ+ ХНН N=5	АИТ+ СД1+ целиа кия N=1	АИТ+ СД1+ вителиг о N=1	АИТ+ ХНН+ вителиг о N=1	АИТ+ СД1+ ХНН+ гастрит N=1	АИТ+ ХНН+ гастри т+ вителиг о N=1
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от В- лимфоцитов	3,8 [2,4; 5,6]	2,3 [0,5; 5,4]	0,8	4,2	6,9	0,4	3,1
CD19 38hi/24hi Breg <i>in vitro</i> , без активатора, % от В- лимфоцитов	3,1 [1,6; 3,75]	0,4 [0,4; 1,2]	0,5	3,1	1,4	0,2	5,5
CD19 38hi/24hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от В- лимфоцитов	5,45 [2,1; 10,5]	1,7 [1,3; 3,4]	8,9	2,4	1,3		
Абсолютный прирост, %	2,0 [0,6; 6,5]	0,9 [0,1; 1,3]	8,4	-0,7	-0,1		
Кратность прироста	1,19 [1, 3; 3,5]	3,25 [1,0; 4,25]	17,8	0,77	0,93		

для признаков, где количество измерений больше 3, описательная статистика представлена в виде Ме [Q1; Q3]

Проведена оценка взаимосвязи количества Breg у пациентов в исследуемых группах и пола, возраста, значений ИМТ, уровней АТ к ТПО и ТТГ в сыворотке крови, дозой левотироксина натрия и длительностью гипотиреоза (таблицы 16-23).

По результатам корреляционного анализа взаимосвязи количества Breg и пола не выявлено во всех группах обследуемых, таблицы 16,17.

Таблица 16. Взаимосвязь содержания Breg и пола в группах пациентов с АИТ и «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ

Группа	АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ		
	М N=4	Ж N=36	p,U-test	М N=3	Ж N=24	p,U-test
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В- лимфоцитов	6,85 [5,3; 7,7]	3,8 [2,0; 7,1]	0,182	4,4; 10,6; 13,2	3,8 [2,2; 6,55]	-
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	2,6 [1,3; 3,6]	3,0 [1,1; 4,9]	0,802	1,3; 4,8; 9,5	2,3 [1,55; 5,75]	-
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	2,75 [1,7; 4,4]	4,9 [2,4; 6,7]	0,341	2,6; 7,4; 14,4	4,65 [2,55; 5,6]	-
Абсолютный прирост, %	1,2 [-1,1; 2,4]	1,35 [-0,2; 3,55]	0,883	1,3; 2,6; 4,9	1,6 [-0,8; 2,95]	-
Кратность прироста	1,6 [0,6; 2,0]	1,6 [0,9; 2,6]	0,802	1,5; 1,5; 2,0	1,7 [0,8; 3,375]	-

Поправка Бонферрони: 0,05/5=0,01

Таблица 17. Взаимосвязь содержание Breg и пола в группах пациентов с АИТ в составе АПС и контрольной группе

Группа	АИТ в АПС			Контрольная группа		
	М N=2	Ж N=22	p,U-test	М N=4	Ж N=16	p,U-test
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В-лимфоцитов	3,2; 9,9	3,5 [2,3; 5,4]	-	3,15 [2,65; 5,3]	4,35 [3,3; 7,45]	0,422
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В-лимфоцитов	1,8; 3,4	2,0 [0,85; 3,75]	-	5,15 [3,5; 7,45]	2,65 [1,45; 4,65]	0,131
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	2,1; 11	3,1 [1,7; 7,0]	-	5,8 [2,9; 15,8]	5,45 [3,8; 7,65]	0,887
Абсолютный прирост, %	0,3; 7,6	1,2 [-0,05; 4,6]	-	0,85 [-0,75; 8,5]	2,6 [-0,1; 4,45]	0,741
Кратность прироста	1,17; 3,24	1, 9 [1,0; 4,0]	-	1,2 [0,8; 2,1]	1,9 [0,9; 3,6]	0,369

Поправка Бонферрони: 0,05/5=0,01

При корреляционном анализе в группе пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ (среди мужчин) и «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ была обнаружена отрицательная высокая корреляционная связь возраста и содержания Врег: с возрастом содержание Врег снижается ( $p=0,005$ ,  $r = -0,94$ ), ( $p=0,009$ ,  $r = -0,50$ ), таблица 18.

Таблица 18. Взаимосвязь содержания Врег и возраста пациентов в группах обследуемых

Группа		АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ			АИТ в АПС			Контрольная группа		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	Общ N=27	М N=3	Ж N=24	Общ N=24	М N=2	Ж N=22	Общ N=20	М N=4	Ж N=16
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	-0,23	<b>-0,94</b>	-0,10	<b>-0,50</b>	-	<b>-0,57</b>	-0,25	-	-0,26	0,09	-0,20	0,15
	p	0,134	<b>0,005</b>	0,531	<b>0,009</b>	-	<b>0,003</b>	0,217	-	0,214	0,719	0,800	0,602
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	-0,26	-0,55	-0,24	-0,03	-	0,01	0,09	-	0,11	0,22	-0,40	0,41
	p	0,085	0,257	0,138	0,889	-	0,948	0,642	-	0,573	0,344	0,600	0,116
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	-0,22	0,09	-0,29	-0,02	-	-0,10	-0,02	-	0,03	0,27	-	0,05
	p	0,165	0,037	0,086	0,910	-	0,632	0,910	-	0,877	0,283	-	0,864
Абсолютный прирост, %	r	-0,08	-0,03	-0,09	-0,16	-	-0,12	-0,06	-	-0,04	-0,10	-0,40	-0,10
	p	0,581	0,957	0,587	0,436	-	0,565	0,751	-	0,839	0,677	0,600	0,704
Кратность прироста	r	0,04	0,26	0,02	-0,07	-	-0,10	0,06	-	0,05	-0,14	-0,40	-0,25
	p	0,803	0,623	0,919	0,734	-	0,654	0,761	-	0,799	0,552	0,600	0,345

Поправка Бонферрони:  $0,05/5=0,01$ . . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.

При анализе взаимосвязи содержания Breg *in vivo* и ИМТ в группе пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ установлена умеренная корреляционная связь содержания Breg и ИМТ: тенденция к снижению количества Breg с увеличением ИМТ ( $p=0,002$ ,  $r = -0,47$ ), таблица 19.

Таблица 19. Взаимосвязь содержание Breg и показателя ИМТ в группах обследуемых

Группа		АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ			АИТ в АПС			Контрольная группа		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	Общ N=27	М N=3	Ж N=24	Общ N=24	М N=2	Ж N=22	Общ N=20	М N=4	Ж N=16
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	-0,01	-0,03	-0,001	-0,41	-	-0,45	-0,17	-	-0,18	-0,39	0,00	-0,43
	p	0,942	0,957	0,992	0,034	-	0,028	0,412	-	0,403	0,114	1,000	0,125
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	-0,25	-0,38	-0,23	-0,08	-	-0,11	-0,23	-	-0,23	0,09	0,40	-0,14
	p	0,098	0,461	0,168	0,697	-	0,594	0,221	-	0,234	0,693	0,600	0,602
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	<b>-0,47</b>	-0,80	-0,39	-0,15	-	-0,18	-0,18	-	-0,18	-0,10	-	-0,15
	p	<b>0,002</b>	0,104	0,019	0,474	-	0,411	0,397	-	0,418	0,692	-	0,593
Абсолютный прирост, %	r	-0,08	-0,77	0,01	-0,02	-	-0,04	-0,21	-	-0,19	-0,12	-0,60	-0,01
	p	0,596	0,072	0,931	0,930	-	0,853	0,267	-	0,324	0,627	0,400	0,966
Кратность прироста	r	-0,07	-0,71	0,01	-0,01	-	-0,02	0,04	-	0,05	-0,12	-0,60	0,03
	p	0,665	0,111	0,931	0,957	-	0,939	0,822	-	0,801	0,609	0,400	0,914

Поправка Бонферрони:  $0,05/5=0,01$ . Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.



При оценке корреляции между содержанием Breg (как *in vivo*, так и *in vitro* до и после стимуляции) и длительностью гипотиреоза, уровнями АТ к ТПО и ТТГ, дозы левотироксина натрия в группах с нарушением аутоиммунитета значимых корреляций не обнаружено, таблицы 20-23.

Таблица 20. Взаимосвязь содержания Breg и уровня АТ к ТПО в группе пациентов с АТ к ТПО  $\geq 5,6$  МЕ/л

Группа		АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ			АИТ в АПС		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	Общ N=27	М N=3	Ж N=24	Общ N=24	М N=2	Ж N=22
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	0,17	0,00	0,24	-0,09	-	-0,02	0,35	-	0,36
	p	0,292	1,000	0,167	0,646	-	0,917	0,114	-	0,105
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,22	0,34	0,21	-0,20	-	-0,26	0,11	-	0,12
	p	0,150	0,512	0,221	0,319	-	0,225	0,604	-	0,583
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	-0,13	-0,10	-0,17	0,02	-	-0,04	-0,10	-	-0,10
	p	0,431	0,873	0,329	0,906	-	0,867	0,667	-	0,651
Абсолютный прирост, %	r	-0,10	0,41	-0,18	-0,04	-	0,04	-0,28	-	-0,30
	p	0,525	0,425	0,297	0,842	-	0,843	0,167	-	0,159
Кратность прироста	r	-0,13	0,41	-0,21	0,20	-	0,14	-0,29	-	-0,30
	p	0,393	0,425	0,222	0,626	-	0,503	0,164	-	0,158

Поправка Бонферрони:  $0,05/5=0,01$

Таблица 21. Взаимосвязь содержания Breg и уровня ТТГ в группе пациентов с АТ к ТПО  $\geq 5,6$  МЕ/л

Группа		АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ			АИТ в АПС		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	Общ N=27	М N=3	Ж N=24	Общ N=24	М N=2	Ж N=22
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В-лимфоцитов	r	-0,17	-0,09	-0,19	0,11	-	-0,01	0,36	-	0,34
	p	0,273	0,872	0,278	0,589	-	0,966	0,102	-	0,126
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,33	0,23	0,37	0,11	-	-0,02	0,15	-	0,13
	p	0,030	0,658	0,023	0,596	-	0,921	0,486	-	0,539
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,00	-0,20	0,00	0,20	-	0,14	-0,08	-	-0,09
	p	0,999	0,747	0,978	0,321	-	0,510	0,722	-	0,688
Абсолютный прирост, %	r	-0,01	0,20	-0,04	0,26	-	0,15	-0,12	-	-0,12
	p	0,939	0,704	0,826	0,198	-	0,498	0,578	-	0,581
Кратность прироста	r	-0,15	0,14	-0,20	0,09	-	0,08	-0,22	-	-0,23
	p	0,324	0,787	0,227	0,645	-	0,710	0,283	-	0,287

Поправка Бонферрони: 0,05/5=0,01

Таблица 22. Взаимосвязь содержания Breg и принимаемой дозы левотироксина натрия в группах обследуемых

Группа		АИТ			Носители АТ к ТПО и/или АТ к ТГ			АИТ в АПС			Контрольная группа		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	общ	М	Ж	Общ N=24	М N=2	Ж N=22	Общ N=20	М N=4	Ж N=16
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,21	-0,17	0,22	-	-	-	-0,17	-	0,16	0,35	-	0,30
	p	0,178	0,742	0,190	-	-	-	0,401	-	0,435	0,153	-	0,290
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	-0,07	-0,07	-0,09	-	-	-	-0,04	-	-0,01	0,45	-	0,57
	p	0,642	0,890	0,569	-	-	-	0,853	-	0,970	0,048	-	0,021
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,13	0,62	0,15	-	-	-	0,15	-	0,15	0,32	-	0,33
	p	0,429	0,269	0,376	-	-	-	0,490	-	0,489	0,196	-	0,228
Абсолютный прирост, %	r	0,11	0,20	0,06	-	-	-	-0,02	-	0,04	-0,46	-	-0,57
	p	0,485	0,700	0,695	-	-	-	0,937	-	0,848	0,041	-	0,022
Кратность прироста	r	0,12	0,29	0,07	-	-	-	-0,07	-	-0,06	-0,50	-	<b>-0,63</b>
	p	0,423	0,577	0,661	-	-	-	0,695	-	0,755	0,025	-	<b>0,009</b>

Поправка Бонферрони: 0,05/5=0,01. Статистически значимые показатели или показатели на уровне статистических тенденций выделены жирным шрифтом.

Таблица 23. Взаимосвязь содержания Breg и длительности АИТ

Группа		АИТ			АИТ в АПС		
		Общ N=40	М N=4	Ж N=36	Общ N=24	М N=2	Ж N=22
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	-0,004	0,38	-0,002	0,11	-	0,12
	p	0,980	0,461	0,993	0,596	-	0,579
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> без активатора, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	-0,23	-0,09	-0,25	0,02	-	0,06
	p	0,135	0,868	0,124	0,931	-	0,780
CD19 38hi/24 hi Breg <i>in vitro</i> с активатором, % от общего кол-ва В- лимфоцитов	r	0,18	0,36	0,16	0,20	-	0,19
	p	0,254	0,553	0,360	0,345	-	0,377
Абсолютный прирост, %	r	0,16	0,70	0,07	0,04	-	0,08
	p	0,307	0,125	0,679	0,817	-	0,677
Кратность прироста	r	0,19	0,58	0,09	-0,07	-	-0,09
	p	0,221	0,228	0,588	0,716	-	0,639

Поправка Бонферрони:  $0,05/5=0,01$

Учитывая полученные результаты можно сделать вывод, различий в содержании В-регуляторных клеток у условно здоровых лиц, бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе аутоиммунного тиреоидита (как изолированного, так и в составе аутоиммунных полигландулярных синдромов) не выявлено; тенденция к снижению содержанию Т-регуляторных клеток и В-регуляторных клеток памяти может являться предиктором развития или маркером аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите вследствие нарушения периферической иммунной толерантности; «носительство» антител к тиреопероксидазе не сопровождается активацией IL-10 продуцирующих В клеток памяти под действием неспецифических активаторов.;

различий в содержании Т-хелперов 1, 2 и 17 типов в группах «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного аутоиммунного тиреоидита и с аутоиммунным тиреоидитом в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома и условно здоровых лиц не выявлено; «носительство» антител к тиреопероксидазе не сопровождается активацией Th1/Th2-опосредованного иммунного ответа, под действием неспецифических активаторов;

для бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного аутоиммунного тиреоидита и преимущественно в группе лиц с аутоиммунным тиреоидитом в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома характерно снижение IL-10 продуцирующих В-регуляторных лимфоцитов при культивировании клеток *in vitro*.

### **3.3. Оценка количества Т и В- лимфоцитов, в т.ч. антигенспецифичных В-лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ**

#### **3.3.1. Подбор условия окрашивания антигенспецифичных В- лимфоцитов**

Для поиска аутоантиген-специфичных В- лимфоцитов подобраны условия окрашивания специфическими красителями на основе ТГ и ТПО, конъюгированных с биотином.

При подготовке антигенов для поиска антиген-специфичных В- лимфоцитов были выявлены ограничения в использовании коммерчески доступной рекомбинантной ТПО, полученной в бактериальной системе экспрессии в клетках *Escherichia coli* (*eTPO*, *Cloud-Clone*, *КНР*). Анализ способности *eTPO* связывать специфические антитела к ТПО из сывороток пациентов методом иммунно-ферментативного анализа выявил снижение сигнала связывания *eTPO* в 2,5 раза по сравнению с сигналом, полученным при использовании стандартного диагностического набора Anti-TPO ELISA (*Euroimmun*, *Германия*). Учитывая особенности экспрессии в прокариотической системе, отличающиеся от естественной среды синтеза ТПО в клетках ЩЖ принято решение использовать антиген с максимально близкими к нативным свойствам. В ГНЦ РФ ФГБУ «НИИ биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» был проведен синтез рекомбинантной ТПО в эукариотической системе экспрессии (*mTPO*). Учитывая уровень сигнала связывания специфических антител к ТПО, оцененный методом иммунно-ферментативного анализа, представленного на рисунке 5, уровень продукции и выход целевого белка было принято решение использовать синтезированную ТПО для дальнейшего исследования.

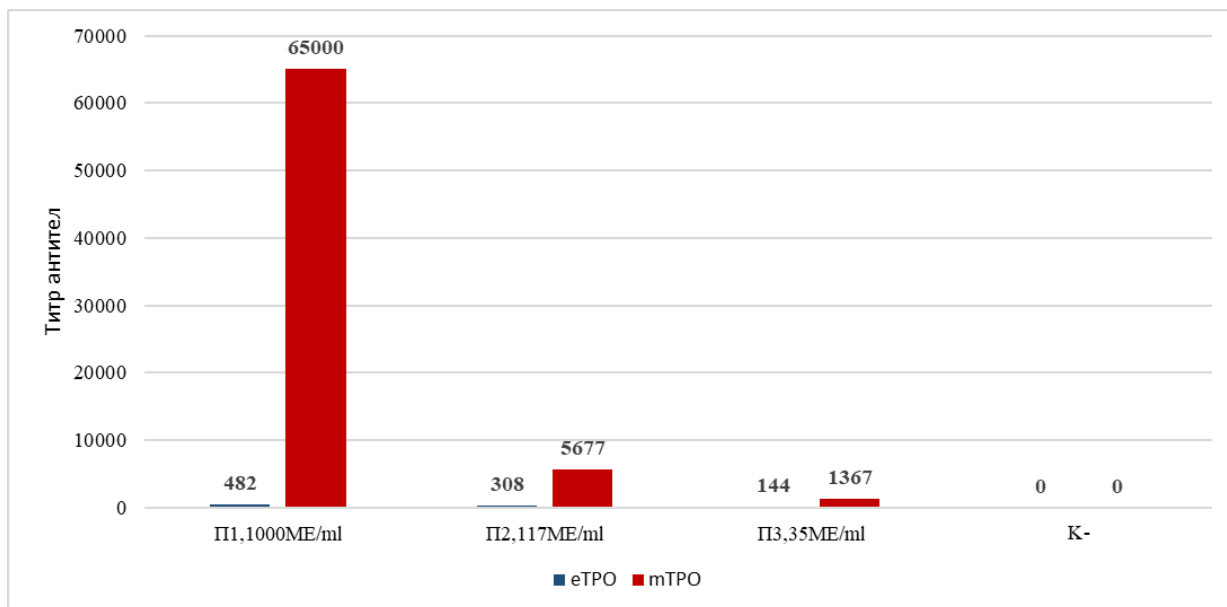


Рисунок 6. Сравнительный анализ связывающей активности коммерческой eTPO и рекомбинантной ТПО, синтезированной в эукариотической системе (mTPO) с антителами из сывороток крови пациентов (П1- пациент с уровнем АТ к ТПО в крови более 1000МЕ/мл, П2- пациент с уровнем в крови АТ к ТПО 117 МЕ/мл, П3- пациент с уровнем АТ к ТПО в крови 3,35 МЕ/мл, К- - пациент с отсутствием АТ к ТПО в крови)

Для поиска ТГ специфических В- лимфоцитов использовали коммерческий белок ТГ, выделенный из крови человека (*Sigma-Aldrich, США*).

Детекция В- лимфоцитов специфичных к ТГ и ТПО, проводилась высокоспецифичным и высокочувствительным методом двойного позитивного окрашивания с использованием биотинилированных аутоантигенов и двух флуоресцентно-меченых конъюгатов стрептавидина: Streptavidin-PE и Streptavidin-Cy5. При оценке двух вариантов окрашивания было установлено, что оптимальная чувствительность и специфичность, необходимые для максимальной эффективности детекции целевых клеток, достигаются при двойном позитивном окрашивании комплексами TG-bio16 и стрептавидина (PE/Cy5) в соотношении 1:1. А в случае ТПО- использование предварительно сформированных комплексов ТПО-bio4 и стрептавидина (PE/Cy5) в молярных соотношениях 1:1.

### 3.3.2. Анализ количества Т- и В- лимфоцитов в пунктатах ЩЖ и крови пациентов

Для получения оптимального количества антигенспецифичных В- лимфоцитов, достаточного для проведения дальнейших исследований по изучению молекулярных особенностей строения антител, проведен подбор оптимального метода получения данных клеток. В таблицах 24-26 представлены данные о количественном содержании Т- и В-

лимфоцитов в крови и пунктах ЩЖ у пациентов «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ без нарушений функции ЩЖ, пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ и условно здоровых лиц (УЗЛ). В результате исследования получено низкое содержание В- лимфоцитов в пунктатах ЩЖ во всех группах исследуемых. Учитывая особенности ТАБ: навигация операторзависимым методом – УЗИ ЩЖ, малое количество клеточного материала, а также диффузный или очаговый тип лимфоидной инфильтрации при АИТ, отбор репрезентативных образцов для дальнейшего поиска антигенспецифичных В-клеток с использованием данного биологического материала не представляется возможным. В связи с чем принято решение изменить объем биологического материала и провести ряд экспериментов по оценке содержания клеток из послеоперационных образцов ткани ЩЖ.



Таблица 24. Содержание В- лимфоцитов в пунктатах ЦЖ

№ пациента	Группа	Характеристика узловых образований	ТТГ, мМЕ/л	АТ к ТГ, МЕ/л	АТ ТПО, МЕ/л	Пунктат	
						Лимфоцитарная масса (ЛМ) в образце пунктата, клеток	CD19+, клеток (% от ЛМ)
1	АИТ (n=2)	EU-THIRADS 4 Размер: 1,5*1,0*0,8	4,17	-	1000,00	10 408	4 137 (39,75)
2		EU-THIRADS 3 Размер: 2,1*1,3*1,0	3,50	300,00	1000,00	794	165 (20,86)
3	«носители» АТ к ТПО и/или ТГ (n=3)	EU-THIRADS 2 Размер: 2,5*2,0*1,5	1,26	-	712,83	4 520	1 097 (24,28)
4		EU-THIRADS 3 Размер: 1,9*1,5*0,9	2,33	80	15,50	583	131 (22,55)
5		EU-THIRADS 3 Размер: 2,1*1,8*1,3	2,85	201,50	357,80	0	0
6	АТ к ТПО и/или ТГ – (n=2)	EU-THIRADS 5 Размер: 1,0*0,9*1,1	1,30	-	5,91	17	0
7		EU-THIRADS 4 Размер: 1,6*1,3*1,0	2,96	7,28	2,56	1438	349 (24,23)

Таблица 25. Содержание Т- лимфоцитов в пунктатах ЩЖ

№ пациента	Группа	Характеристика узловых образований	ТТГ, мМЕ/л	АТ к ТГ, МЕ/л	АТ к ТПО, МЕ/л	Пунктат	
						Лимфоцитарная масса (ЛМ) в образце пунктата, клеток	CD3+, клеток (% от ЛМ)
1	АИТ (n=2)	EU-THIRADS 4 Размер: 1,5*1,0*0,8	4,17	-	1000,00	10 408	5 074 (48,76)
2		EU-THIRADS 3 Размер: 2,1*1,3*1,0	3,50	300,00	1000,00	2 407	1627 (67,6)
3	«носители» АТ к ТПО и/или ТГ (n=3)	EU-THIRADS 2 Размер: 2,5*2,0*1,5	1,26	-	712,83	4 520	2 830 (62,6)
4		EU-THIRADS 3 Размер: 1,9*1,5*0,9	2,33	80	15,50	2 187	1 424 (65,12)
5		EU-THIRADS 3 Размер: 2,1*1,8*1,3	2,85	201,50	357,80	1 484	1 027 (69,2)
6	АТ к ТПО и/или ТГ – (n=2)	EU-THIRADS 5 Размер: 1,0*0,9*1,1	1,30	-	5,91	17	0
7		EU-THIRADS 4 Размер: 1,6*1,3*1,0	2,96	7,28	2,56	620	23 (3,69)

Таблица 26. Содержание Т- и В- лимфоцитов в крови пациентов

№ пациента	Группа	ТТГ, мМЕ/л	АТ к ТГ, МЕ/л	АТ к ТПО, МЕ/л	Кровь		
					Лимфоцитарная масса (ЛМ) в образце пунктата, клеток	CD19 <sup>+</sup> , % от ЛМ	CD3 <sup>+</sup> , % от ЛМ
1	АИТ	4,17	-	1000,00	110 476	15 016 (13,59)	64 470 (58,36)
2	«носитель» АТ к ТПО и/или ТГ	1,26	-	712,83	122 484	29 941 (24,0)	67 734 (55,3)
3	АТ к ТПО и/или ТГ —	1,30	-	5,91	111 415	19 500 (17,5)	61 109 (54,5)

### 3.3.3. Анализ содержания В- лимфоцитов в ткани ЩЖ

В рамках исследования был сформирован банк образцов ткани ЩЖ пациентов, оперированных по поводу узловых образований разной степени злокачественности или увеличением объема ЩЖ с синдромом компрессии трахеи и сопутствующим гипотиреозом в исходе АИТ, «носителем» АТ к ТПО и/или ТГ без нарушений функции ЩЖ и контрольных лиц с нормальными показателями АТ к ТПО и/или ТГ в сыворотке крови. Характеристика обследуемых представлена в таблице 27.

Таблица 27. Характеристика участников исследования

Признак	«носители» АТ к ТПО и/или ТГ		АИТ		АТ к ТПО и/или ТГ –	
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)
Возраст, лет	5	43 [20;60]	5	41 [37;54]	2	38;70
Женский пол	5	5 (100%)	5	5 (100%)	2	2 (100%)
ТТГ, мМЕ/л	5	1,566 [1,088; 2,081]	5	3,452 [1,651; 4,773]	2	0,152; 2,154
АТ к ТГ, МЕ/л	5	295,1 [40,91; 476,7]	5	268,4 [32,68;489,4]	2	12,77; 13,14
АТ к ТПО, МЕ/л	5	252,3 [41,85;804,3]	5	572,21 [123,9;1000,0]	2	0,64; 0,70
ИМТ	5	21 [18,2; 30,5]	5	31 [24;40]	2	21,6; 29,4
Длительность АИТ	-	-	5	5 [1;10]	-	-
Доза левотироксина натрия	-	-	5	75 [75;88]	-	-

Все пациенты с нарушениями аутоиммунитета («носители» АТ к ТПО и/или ТГ и пациенты с гипотиреозом в исходе АИТ) имели повышенный уровень АТ к ТПО ( $\geq 5,6$  мМЕ/л), а повышенный титр АТ к ТГ ( $\geq 115$  МЕ/л) имели 3 из 5 пациентов в группе с гипотиреозом в исходе АИТ, 4 из 5 в группе «носители» АТ к ТПО и/или ТГ. Данные о содержании CD45+ и CD19+ клеток в исследуемых образцах представлены в таблице 28, стратегия гейтирования образцов в ходе цитометрического анализа доли В- лимфоцитов представлена на рисунке 7. Анализ результатов показал высокую долю В-клеток в образцах больных АИТ и «носителей» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ, которая варьировала от 30,7% до 65,4% от общего содержания лейкоцитов. В группе лиц с нормальными показателями АТ к ТПО и/или ТГ в сыворотке крови были выявлены В- лимфоциты в меньших количествах 18,3 и 23,0%.

Таблица 28. Доля CD45+ лейкоцитов и CD19+ В- лимфоцитов в образцах клеток ткани ЩЖ пациентов.

Признак	«носители» АТ к ТПО и/или ТГ		АИТ		АТ к ТПО и/или ТГ –	
	N	Me [Q1; Q3]	N	Me [Q1; Q3]	N	
Лимфоцитарная масса (ЛМ) в образце ткани ЩЖ, клеток	5	107931 [1868; 256028]	5	120867 [67; 277083]	2	2360; 2400
Доля CD45+ лейкоцитов, %	5	36,2 [15,2; 66,4]	5	43,7 [33,8; 70,0]	2	44,7; 64,0
Доля CD19+ В-лимфоцитов, %	5	48,7 [30,7; 55,6]	5	53,8 [32,5; 65,4]	2	18,3; 23,0

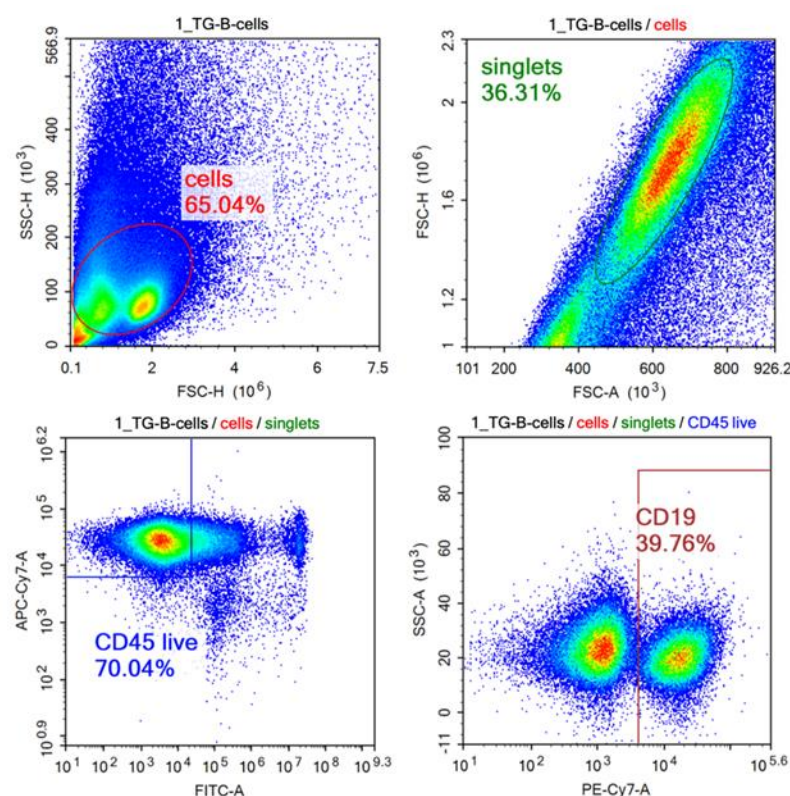


Рисунок 7. Цитометрический анализ доли В- лимфоцитов одного из исследуемых образцов клеток ткани ЩЖ, полученного от пациента с АИТ. Стратегия гейтирования образцов: по показателям бокового и прямого светорассеяния выбирали популяцию по размеру клеток, выделяли области одиночных клеток, из них далее рассматривали только те клетки, которые не окрашиваются красителем SytoxGreen (живые клетки) и образуют субпопуляцию CD45+ клеток, далее выделяли область CD19+ В-клеток.

### 3.3.4. Анализ содержания антигенспецифичных клеток в ткани ЩЖ

Результаты цитометрического анализа двойных положительных антиген-специфичных В-клеток, окрашенных подобранным оптимальным методом описанным выше, во всех полученных образцах представлены в таблице 29. Доля аутореактивных к ТГ В- лимфоцитов в проанализированных образцах ЩЖ составила 0,0-0,11%, Доля аутореактивных к ТПО В- лимфоцитов в образцах ЩЖ составила 0,0-0,09%. По результатам определяются минимальные количества антигенспецифичных В- лимфоцитов, содержание которых недостаточно, для дальнейшего анализа структуры антител в рамках поиска различий между «носителями» АТ к ТПО и/или АТ к ТГ и пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ в рамках поиска прогностических маркеров прогрессирования АИТ. При анализе содержания антигенспецифичных лимфоцитов в крови у пациентов с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ и в группе лиц с нормальными показателями АТ к ТПО и/или ТГ определено эквивалентное количество, содержащееся в ткани ЩЖ (0,01-0,02%). Данное количество мало для проведения дальнейшего исследования молекулярных структур специфичных клеток.

Таблица 29. Содержание ТГ и ТПО специфичных В- лимфоцитов в образцах тканей ЩЖ пациентов с АИТ и «носителей» аутореактивных антител.

Признак	«носители» АТ к ТПО и/или ТГ		АИТ		АТ к ТПО и/или ТГ –	
	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	Me [Q1; Q3] / n (%)	N	
Доля ТГ+ В- лимфоцитов, %	5	0,01 [0; 0,05]	5	0,01 [0; 0,11]	2	0; 0
Доля ТПО+ В- лимфоцитов, %	5	0,02 [0; 0,07]	5	0,02 [0,01; 0,09]	2	0; 0

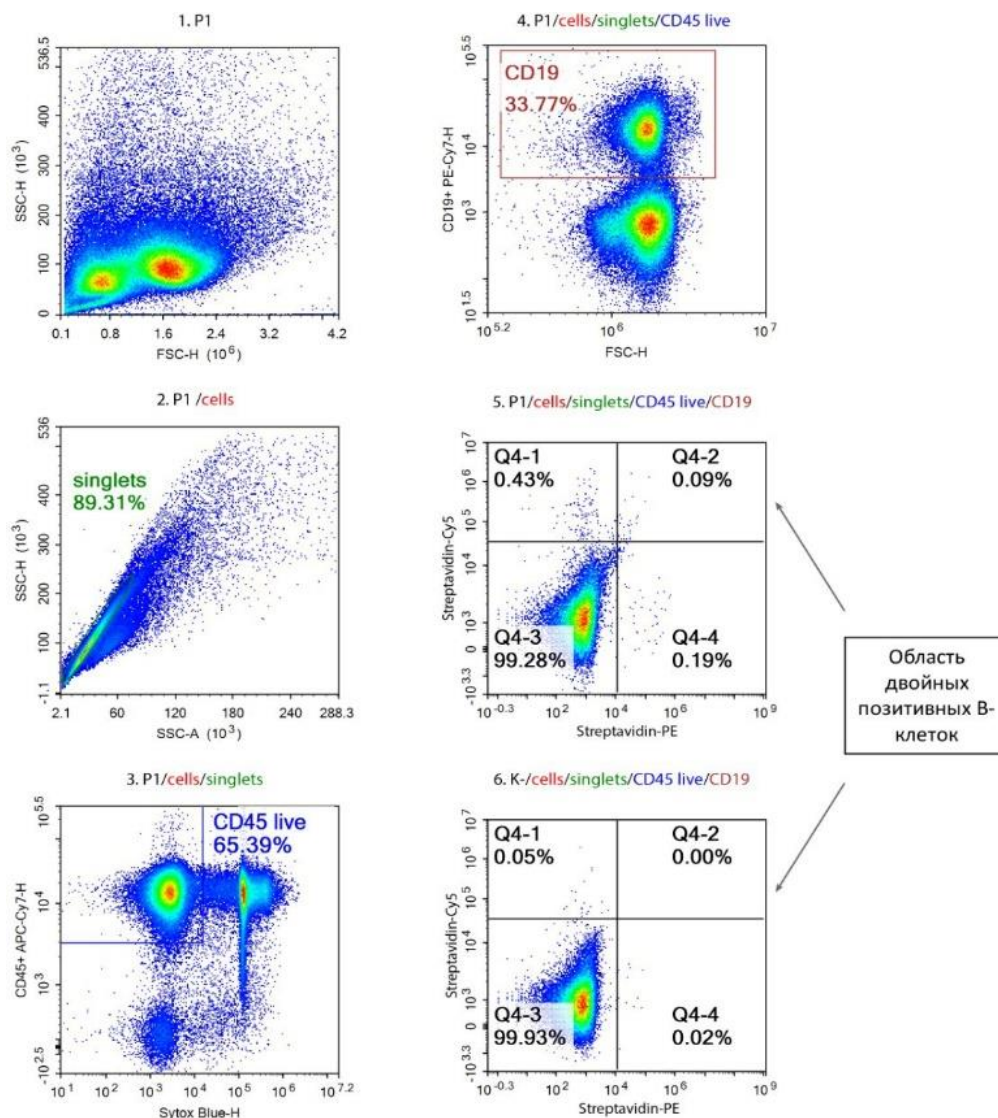


Рисунок 8. Детекция ТПО-специфических В- лимфоцитов методом двойного позитивного окрашивания одного из образцов, полученных от пациента с АИТ. Стратегия гейтирования образцов: по показателям бокового и прямого светорассеяния выбирали популяцию по размеру клеток (1), выделяли области одиночных клеток (2), из них далее рассматривали только те клетки, которые не окрашиваются красителем SytoxBlue (живые клетки) и образуют субпопуляцию CD45-положительных клеток (3). Далее выделяли область CD19+ В-клеток (4). Среди всех В клеток анализировали субпопуляцию двойных-позитивных клеток – тех, которые связывают комплексы ТРО-bio4-Streptavidin (PE/Cy5) (5). В качестве отрицательного контроля использовали образец клеток здорового донора (6).

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЯ

### 4.1. Оценка распространенности «носительства» АТ к ТПО и факторов, ассоциированных АИТ

Официальная статистика заболеваемости свидетельствует о высокой распространенности заболеваний ЩЖ среди всех эндокринных патологий (Росстат). Одной из причин роста заболеваемости является сохраняющаяся проблема йододефицита в Российской Федерации, что вызывает интерес к его влиянию на развитие и течение АИТ. Исследование частоты встречаемости АИТ в регионах с различным уровнем йодной обеспеченности помогут выявить региональные эпидемиологические закономерности, которые могут стать основой для разработки эффективных региональных программ профилактики.

Распространенность АИТ существенно варьирует в зависимости от географического региона и этнического происхождения [77]. Согласно данным мета-анализа, среднее мировая распространенность АИТ среди взрослого населения составляет 7,5% [3]. В исследовании Фадеева В.В., Мельниченко Г.А., Ванушко В.Э., среди 260 пациентов (лица старше 60 лет, проживающие в домах престарелых г. Москва), «носительство» АТ к ТПО составило 16,9% [4]. Согласно данным, полученным в рамках международных проектов «MONICA» и «НАРИЕЕ» в группе жителей Новосибирской области повышенные показатели АТ к ТПО выявлены у 3,5%-16% обследуемых в зависимости от возраста [5].

Настоящее исследование проведено в Тульской области и Чеченской Республике - регионах сопоставимых по численности населения и уровню йодной обеспеченности. Согласно данным исследований, проведенных в 2022 г. степень тяжести йодного дефицита соответствует лёгкой (медиана йодурии 69,1 мкг/л и 71,3 мкг/л соответственно) [4,6]. Распространенность «носительства» АТ к ТПО в проведенном нами исследовании составила 25%, что превышает литературные данные. Наблюдаемые различия, вероятно, связаны со смещением выборки в сторону лиц, состоящих на диспансерном наблюдении по поводу ранее диагностированных хронических неинфекционных заболеваний, включая эндокринную патологию. Данное ограничение обусловлено методом формирования выборки, при котором включение участников осуществлялось преимущественно из базы данных лечебно-профилактических учреждений и охватывало лиц, активно обращающихся за медицинской помощью.

Масштабные популяционные исследования, в том числе классическое популяционное проспективное когортное исследование Whickham, показали, что аутоиммунные патологии ЩЖ преобладают среди женщин и распространенность



«носительства» АТ к ТПО увеличивается с возрастом (после 45 лет) [77], что было подтверждено проведенным исследованием, средний возраст лиц, из группы «носителей» АТ к ТПО составляет 49 лет.

АИТ является основной причиной гипотиреоза. Согласно исследованию Whickham ежегодно у 5% пациентов с повышенным титром АТ к ТПО и/или ТГ развивается гипотиреоз. Исследование в Норвегии показало, что при уровне ТТГ более 10 мЕ/л, 85 % пациентов имели положительные АТ к ТПО [78]. В нашем исследовании у 61,76% пациентов причиной гипотиреоза был АИТ, что соответствует данным литературы.

В проведенном исследовании обнаружена выявлена корреляция между уровнями ТТГ и АТ-ТПО в сыворотке крови ( $p=0,006$ ,  $R=0,23$ ) в группе «носителей» АТ к ТПО, однако согласно литературным данным, такая взаимосвязь отсутствует у эутиреоидных «носителей» антител [93,94]. В исследуемой группе «носителей» АТ к ТПО 30% участников имели в анамнезе гипотиреоз в исходе АИТ и/или ТТГ  $> 4$  мЕ/л, что вероятнее всего внесло вклад в полученную корреляционную связь и не позволяет сделать вывод о выявленной взаимосвязи.

Для АИТ характерна вариабельность объема ЩЖ – уменьшение до атрофического варианта при активных механизмах апоптоза тиреоцитов и увеличение до гипертрофического зоба, за счет выраженной лимфоидной инфильтрации. Согласно литературным данным 11% пациентов с повышенным титром АТ к ТПО и/или ТГ имели атрофический вариант АИТ ( $V$  менее 4,5-5,5 мл), а 31% гипертрофический вариант АИТ [79]. По данным нашего исследования группы пациентов с повышенным уровнем АТ к ТПО и условно здоровые лица не различались по объему ЩЖ. У 14,3% пациентов с повышенным уровнем АТ к ТПО объем ЩЖ был менее 4 см<sup>3</sup>, из них гипотиреоз наблюдался у 3 пациентов (30%); у 23,07% пациентов объем ЩЖ был увеличен, гипотиреоз - у 12 (36,4%) из них. Согласно данным нашего исследования нарушение функции ЩЖ в большинстве случаев не связано с объемом ЩЖ, как это описывается в некоторых исследованиях [80,81].

В рамках поиска факторов, влияющих на функцию ЩЖ при АИТ и прогрессирование аутоиммунного процесса, значимых корреляций между уровнем АТ к ТПО и результатами УЗ-исследования и анамнестическими данными не обнаружено. Распространённость узловых новообразований ЩЖ у пациентов с АИТ варьирует от 20% до 50% и зависит от методов диагностики и региона исследования, а роль АИТ в процессах формирования узловых форм ЩЖ неоднозначна. Отсутствие корреляции между наличием узловых образований ЩЖ и АТ к ТПО, показанная в том числе в нашем исследовании, предполагает независимость механизмов формирования данных изменений и указывает на их параллельное развитие [6].

Высокая распространенность АИТ среди женщин предполагает взаимосвязь данного заболевания с факторами, связанными с репродуктивной функцией. В рамках проведенного исследования не выявлено взаимосвязи между «носителем» АТ к ТПО и наличием родов за последние 12 месяцев в анамнезе, и приемом комбинированных оральных контрацептивов (КОК). Однако известно, что пик заболеваемости и прогрессирования аутоиммунных нарушений ЩЖ приходится на первый год после родов. Во время беременности происходят значительные изменения, направленные на формирование иммунологической супрессии, что позволяет плоду развиваться, не будучи атакованным иммунной системой матери. В норме происходит сдвиг в сторону Th2-ответа, способствующего предотвращению отторжения плода. Согласно теории о микрохимеризме, во время беременности клетки плода проникают с током крови через плаценту в организм матери, циркулируя в крови даже после рождения ребенка. Более того, они могут оседать в ткани ЩЖ провоцируя развитие аутоиммунных воспалительных реакций [82]. В послеродовой период иммунная система матери восстанавливается и выходит из состояния иммуносупрессии: снижается активность регуляторных клеток иммунитета и восстанавливается баланс Th1/Th2. Эти изменения помогают формировать адаптивные механизмы против химерных клеток, что увеличивает риск развития аутоиммунных заболеваний у матери в первый год после родов [83]. Повторяющиеся изменения в иммунной системе при многократных беременностях могут потенциально снижать её способность к дальнейшей адаптации и привести к прогрессированию нарушений аутоиммунитета. В нашем исследовании 40% женщин с повышенным уровнем АТ к ТПО имеют 3х и более детей в анамнезе, что значительно больше, чем в группе лиц, у которых уровень АТ к ТПО в крови соответствует референсным значениям лаборатории. Наше исследование проведено в двух регионах – Тульской области и Чеченской республике, которые согласно официальными данными статистики имеют региональные различия в распространенности многодетности: распространенность многодетных семей в Чеченской Республике составляет 121 074 семей, а в Тульской области 16 406 семей, несмотря на отсутствие данных различий при анализе исследуемой когорты пациентов. Полученные результаты позволяют выделить пациенток с 3мя и более беременностями в анамнезе в группу более высоко риска прогрессирования и развития АИТ, однако отсутствие данных полного гинекологического анамнеза, содержащего сведения о любых исходах беременностей (аборты, выкидыши, мертворождение) не позволяет с высокой степенью достоверности утверждать об усиленном влиянии многодетности на риск развития АИТ, в связи с чем необходимо проведение дополнительных исследований на более крупных целевых выборках.

## 4.2. Механизмы нарушений иммунологической толерантности при АИТ

В последние годы основной целью исследований, посвященных АИТ, является поиск новых прогностических маркеров гипотиреоза. В ходе изучения патогенеза АИТ, анализ клеточного компонента иммунной системы - ключевого участника аутоиммунных реакций, привел к осознанию того, что иммунологические показатели могут быть использованы в качестве маркеров прогрессирования заболевания, и потенциальными молекулярными целями для терапии, направленной на прекращение аутоиммунных процессов.

Патогенез АИТ многогранен и многокомпонентен. На протяжении длительного времени появляются исследования, показывающие достоверные различия в содержании клеточных компонентов у пациентов с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ. Многие исследования противоречивы. Выделить ключевое звено патогенеза АИТ сложно, каждый компонент вносит свой вклад в развитие воспалительного процесса в ЩЖ.

До открытия новых видов эффекторных Т- лимфоцитов, таких как Th17, Th9 и Th22, АИТ рассматривался в первую очередь, как Th1-опосредованное заболевание. Главная функция Th1 клеток заключается в активации клеточно-опосредованной реакции повреждения тканей, что может способствовать прогрессированию заболевания. Анализ содержания Th1 и Th2 клеток в крови у пациентов с повышенными АТ к ТПО по данным некоторых исследований показал, что количество Th1 клеток преобладает по сравнению с условно здоровыми лицами [84]. В других исследованиях было показано большее содержание Th2 клеток, которые способствуют гуморальной иммунной реакции, стимулируя продукцию АТ у пациентов с данными нарушениями [85]. В нашем же исследовании мы не обнаружили различий в содержании Th1 и Th2 клеток у пациентов с АИТ и условно здоровых лиц. Этот результат свидетельствует о сложности и многогранности патогенетических механизмов АИТ, и вовлеченности как Th1, так и Th2 – клеток в развитие и прогрессирование заболевания.

В современных исследованиях одним из ключевых компонентов патогенеза АИТ является дисбаланс IL17- продуцирующих Т- лимфоцитов (Th17) и IL10- продуцирующих CD25<sup>+</sup>FoxP3 Т- лимфоцитов (Treg): снижение количества и ослабление функции Treg, которые противодействуют противовоспалительной активности Th17, приводит к увеличению последних. Согласно данным мета-анализа, уровни Th17 и Treg у пациентов АИТ отличаются от группы здоровых лиц [11]. В нашем исследовании выявлена тенденция к увеличению уровня Th17 в группах пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ и в составе АПС и к уменьшению Treg в группах пациентов с нарушениями аутоиммунитета, особенно «носителей» АТ к ТПО, что соответствует данным литературы

Исследования, посвященные изучению Breg у пациентов с аутоиммунными заболеваниями ЩЖ, единичны. Описаны противоречивые данные о Breg в периферической крови у пациентов с АИТ - наблюдается как сниженное количество Breg, так и нормальное или повышенное в сравнении со условно здоровыми лицами [89–91]. Однако, независимо от количественных показателей, клетки характеризуются недостаточной экспрессией IL-10. Функцией Breg является поддержание периферической толерантности, ингибирование аутоиммунных реакций, за счет выработки IL-10, TGF- $\beta$ , Fas-лиганда и экспрессии связанного с TNF лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL). В нашем исследовании на малой выборке выявлено различие в абсолютных значениях количества Breg при инкубации *in vitro* с дополнительной активацией, у пациентов с повышенным титром АТ к ТПО ( $\geq 5,6$  МЕ/л) количество данных клеток выше в сравнении со здоровыми донорами. Однако при анализе большего количества пациентов и разделения их на целевые группы (бессимптомных носителей и лиц с гипотиреозом) данного увеличения не выявлено. Более того, в группе пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ в составе АПС отмечена тенденция к снижению количества Breg в сравнении с условно здоровыми лицами ( $p=0,019$ ), в связи с отсутствием различий в содержании данных клеток у пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ, можно предположить, что ключевой вклад в данное снижение вносят сопутствующие аутоиммунные патологии.

При анализе IL-10 -продуцирующих В- лимфоцитов выявлено сниженное содержание данных клеток в группах пациентов с гипотиреозом (как в исходе изолированного АИТ, так и в составе АПС), что указывает на снижение их функциональной активности и нарушений основной функции по выработке IL-10. Сниженное содержание IL10Breg у пациентов с нарушениями аутоиммунитета, при нормальном или повышенном содержании Breg, подтверждает их роль в регуляции периферической толерантности за счет снижения их функциональной активности, что отражает отсутствие эффективного ингибирования аутоагрессивных Т- лимфоцитов, что ведет к прогрессированию воспалительного процесса в ЩЖ. В исследованиях M.G. Santaguida, I. Gatto и S. Capriello, S.M. Ferrari, I. Gatto данные противоречат полученным нами результатам: различий в содержании CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Breg у пациентов с АИТ от условно здоровых лиц не выявлено, однако дополнительные аутоиммунные заболевания в анамнезе повышали содержание данных клеток. Содержание IL10Breg у пациентов с АИТ и АИТ в сочетании с другими аутоиммунными заболеваниями было выше, в сравнении с здоровыми лицами, что также противоречит полученным нами результатам [89,91]. Повышенное содержание регуляторных В- лимфоцитов, в т.ч. IL-10 продуцирующих В- лимфоцитов по мнению

авторов подавляют проапоптотическую и провоспалительную реакцию Th1 и Th17. Увеличение числа Breg может быть объяснено компенсаторной реакцией иммунной системы на хроническое воспаление и попыткой ограничить аутоиммунный процесс. Противоречивые данные могут быть обусловлены различиями в методиках выделения и идентификации Breg. Данная группа клеток гетерогенна и имеет несколько фенотипов, в связи с чем основная детекция осуществляется по функциональной активности, одной из которых является продукция IL10.

По результатам исследования в группе «носителей» АТ к ТПО выявлена корреляционная связь в уменьшении содержания Breg с возрастом. Учитывая повышение риска прогрессирования АИТ с возрастом, данный факт может являться косвенным признаком прогрессирования аутоиммунного процесса. Корреляционной связи содержания Breg с уровнем АТ к ТПО, уровнем ТТГ, дозой принимаемой терапии левотироксином натрия и длительностью АИТ. Данные взаимодействия также не выявлены по результатам других исследований [90,91]

CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В регуляторные клетки памяти, являются подгруппой В регуляторных лимфоцитов, одной из основных функций которых является также продукция IL10. Исследования, посвященные изучению данной группы клеток у пациентов с АИТ единичны, и различий в их содержании в сравнении со здоровыми лицами не описано [92]. Однако в исследованиях на группах пациентов с неэндокринными аутоиммунными заболеваниями описывается повышенная экспрессия IL10 данными клетками. В проведенном нами исследовании выявлена тенденция к снижению содержанию В-регуляторных клеток памяти у пациентов с нарушениями аутоиммунитета, к тому же при добавлении специфических активаторов индукция новых В регуляторных клеток памяти не происходила и даже отмечалось некоторое снижение их содержания. Вероятнее всего это связано с исходной гиперактивацией данных клеток, которые в условиях дополнительной активации могли разрушаться. Однако, при анализе способности В регуляторных клеток памяти секретировать IL10 выявлена повышенная продукция данного цитокина в группах пациентов с нарушениями аутоиммунитета, что указывает на сохранение их функциональной активности.

При оценке изменений клеточного состава и поиска возможных различий у пациентов бессимптомных «носителей» АТ к ТПО и пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ (как изолированного, так и в составе АПС) различий в изучаемых субпопуляциях лимфоцитов не выявлено. Учитывая полученные результаты, однозначных выводов, о возможности использовать определенные клеточные популяции, как прогностические маркеры гипотиреоза, сделать невозможно.

Выявленные потенциальные различия в содержании исследуемых субпопуляций лимфоцитов у пациентов с АИТ подчёркивают необходимость дальнейших исследований, которые должны включать более крупные целевые группы пациентов. Такой подход может предоставить более точные данные, что, в свою очередь, позволит сделать обоснованные выводы и внести существенный вклад в понимание патогенеза АИТ, и разработку новых диагностических стратегий.

#### **4.3 Оценка количества Т и В- лимфоцитов, в т.ч. антигенспецифичных В-лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ**

Учитывая органоспецифическое поражение ткани ЩЖ при АИТ, специализацию В-лимфоцитов в антигенспецифичные и запуск продукции антител непосредственно в ткани ЩЖ, для исследования более точных патогенетических механизмов актуальным направлением исследований, является анализ иммунокомпетентных клеток в ткани ЩЖ. Согласно данным литературы для аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка существуют данные об определенных гермлайнах антител, которые коррелируют с прогрессией заболеваний.

Целью третьего этапа работы являлось изучение ТГ и ТПО-специфичных В-лимфоцитов в ткани ЩЖ. В мировой литературе нет отработанной методики выделения и окраски специфичных клеток из ткани ЩЖ. Нами были установлены типы антигенов, которые необходимо использовать для детекции специфичных лимфоцитов – рекомбинантный ТГ, выделенный из крови человека (TG-bio16) и рекомбинантную ТПО, выделенную из эукариотических клеток (ТРО-bio4). Антигены синтезированные в эукариотических клетках представлены с наибольшим количеством эпитопов, соответствующих нативным антигенам.

Для высокой специфичности и чувствительности детекции целевых клеток были подобраны условия окрашивания клеток комплексами биотинилированных антигенов с флуоресцентно-мечеными стрептавидами. Благодаря высокой аффинности взаимодействия биотина со стрептавидином, биотинилированные аутоантигены могут быть детектированы с помощью стрептавида, конъюгированного с флуоресцентными метками. В качестве биотинилирующего агента использовался водорастворимый EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific), содержащий N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), который селективно реагирует с  $\epsilon$ -аминогруппами лизиновых остатков белков, образуя стабильную ковалентную связь. Оптимальная чувствительность и специфичность, достигаются при двойном позитивном окрашивании комплексами TG-bio16 и

стрептавидина (РЕ/Cy5) в соотношении 1:1 и комплексов ТРО-bio4 и стрептавидина (РЕ/Cy5) в молярных соотношениях 1:1.

В образцах ткани ЩЖ у пациентов «носителей» АТ к ТПО и пациентов с гипотиреозом в исходе АИТ доля аутореактивных В- лимфоцитов составила 0,01-0,02%. В группе условно здоровых специфичные клетки не обнаружены, однако различий в группах «носителей» АТ к ТПО и пациентов с гипотиреозом не выявлено. Для поиска различий, которые могут являться маркерами прогрессии АИТ, необходимы дальнейшие исследования, посвященные изучению молекулярных структур аутоантител В-лимфоцитов, для более глубокого понимания механизмов аутоиммунных процессов, происходящих в тканях ЩЖ.

### **Ограничения исследования**

Одним из ограничений первого исследования является смещение выборки, в сторону лиц, наблюдающихся в медицинских учреждениях Тульской области и Чеченской Республики, на базе которых проводился набор участников исследования, по поводу имеющихся хронических неинфекционных заболеваний (сахарный диабет, артериальная гипертензия, злокачественные новообразования и др.). Вторым ограничением первого исследования является возможное влияние транспортировки образцов крови на преаналитический этап лабораторного анализа, возможность его выполнения и достоверность полученного результата. Учитывая отдаленность районов от г. Москвы (Тульская область –183 км; Чеченская Республика – 1854 км), длительность транспортировки составляла от 3 до 12 часов. Третьим ограничением первого исследования является неполнота собранных анамнестических данных в ходе анкетирования. Некоторая часть данных представлена в неполном объеме в связи с отказами участников исследования отвечать на отдельные вопросы, а гинекологический анамнез женщин не включал информацию об исходах беременностей, кроме родов (таких как аборты, неразвивающиеся беременности и другие)-эти факторы обладают сходным влиянием на состояние иммунной системы и могут выступать триггерами патологических иммунологических реакций.

Второе исследование также имело некоторые ограничения. Сравнимые когорты пациентов («носители» АТ к тканям ЩЖ, с гипотиреозом в исходе АИТ, с гипотиреозом в составе АПС, контрольная группа) не сопоставимы по возрасту, что обусловлено желанием минимизировать количество факторов, потенциально влияющих на лимфоцитарный состав крови, в связи с чем, к участию приглашались лица без острых/тяжелых хронических заболеваний, которые в большинстве случаев относились к лицам молодого возраста. При транспортировке образцов цельной крови могли произойти нарушения преаналитического

этапа (температурные условия, механические повреждения и др.), которые повлияли на выживаемость клеток и их количество в итоговых экспериментах. Неполнота данных по оценке клеточного состава крови у части участников, обусловленная техническими артефактами при проведении анализов.

Ограничением третьего исследования является отсутствие единообразия забора послеоперационных образцов ткани ЩЖ, которые могли повлиять на лимфоцитарный клеточный состав в анализируемых образцах. Забор проводился с макроскопической оценкой очагов инфильтрации, которая осуществлялась сотрудниками лаборатории патоморфологии; объем образцов был различен и зависел от объема оперативного лечения (тотальная тиреоидэктомия и гемитиреоидэктомия), нативного объема ЩЖ и разной степени распространенности узловых образований (забор материала осуществлялся из наиболее удаленного от узлового образования участка).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АИТ является самой распространенной аутоиммунной патологией ЩЖ. С учетом его "доброкачественного" течения, современные исследования направлены на выявление прогностических маркеров гипотиреоза, как основного осложнения АИТ. В контексте данной проблемы актуально изучение патогенетических механизмов заболевания. Учитывая ключевую роль клеточного иммунитета в патогенезе АИТ, актуальным представляется исследование репертуара аутореактивных и иммунокомпетентных клеток, а также анализ регуляторного звена иммунитета у лиц с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ.

В проведенном исследовании оценена распространенность АТ к ТПО 25%, (95% ДИ (21%; 28%)) среди жителей двух регионов, сопоставимых по численности населения и йодной обеспеченности. В рамках оценки факторов риска прогрессирования АИТ результаты исследования показали, что в группе женщин с высокой частотой деторождения  $\geq 3$  распространенность АИТ значительно выше в сравнении с условно здоровыми лицами, и информация о наличии трёх и более детей в гинекологическом анамнезе женщины является фактором риска прогрессирования АИТ. Однако в связи с отсутствием информации о других исходах беременности (аборт, мертворождение, выкидыш) для подтверждения данного предположения требуются исследования на большей целевой выборке.

При анализе регуляторного звена клеточного иммунитета у бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам ЩЖ, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ и пациентов с АИТ в составе АПС выявлено сниженное количество В - регуляторных клеток памяти. Сниженное количество Т-регуляторных клеток выявлено в группах «носителей» АТ к ТПО и у лиц с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ, а у пациентов с АИТ в составе АПС выявлено угнетение В - регуляторного звена. Тенденция к снижению содержанию Т-регуляторных клеток и В-регуляторных клеток памяти может является предиктором развития или маркером аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите вследствие нарушения периферической иммунной толерантности. В ходе исследования у пациентов с АИТ (как изолированным, так и в составе АПС) под действием неспецифических активаторов наблюдалось увеличение активности IL-10 продуцирующих В клеток памяти, однако в группе «носителей» АТ к ТПО и у условно здоровых лиц данная активность не фиксировалась.

В группах с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ, преимущественно в группе лиц с АИТ в составе АПС, выявлено сниженное количество IL-10 продуцирующих В регуляторных лимфоцитов при культивировании клеток *in vitro*. Данные клетки являются

ключевыми участниками механизмов поддержания иммунологической толерантности, а их сниженное количество характерно для её нарушений.

В ходе анализа Т- лимфоцитарного звена выявлена тенденция к увеличению количества Th17- лимфоцитов в группе пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного АИТ и значимое сниженное количество данных клеток в группе пациентов с АПС в сравнении с условно здоровыми лицами. Данное наблюдение подчеркивает важность Th17 подмножества Т-хелперных клеток в течение АИТ. Требуются дальнейшие исследования содержания данной группы клеток на целевых группах с нарушениями аутоиммунитета ЩЖ для углубленного понимания механизмов патогенеза АИТ и разработки эффективных методов прогнозирования гипотиреоза.

Различий в содержании Th-1 и Th- 2 в группах «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного аутоиммунного тиреоидита и с аутоиммунным тиреоидитом в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома и условно здоровых лиц не выявлено, и при анализе функциональной активности Th-1 и Th- 2 по действию неспецифических активаторов в группе «носителей» АТ к ТПО активации Th1/Th2-опосредованного иммунного ответа не наблюдалось. Однако, повышение активности было выявлено в группах пациентов с АИТ и АИТ в составе АПС, что характерно для активного аутоиммунного процесса. Учитывая полученные результаты, рассматривать данные клетки, как единственные маркеры аутоиммунного процесса при АИТ не целесообразно.

Дальнейшие исследования с более крупными целевыми выборками лиц-носителей антител к ТПО и лиц с гипотиреозом в исходе АИТ позволят более точно оценить иммунологические параметры у данной категории пациентов. Фундаментальные исследования помогут определить ключевые молекулярные механизмы, которые способны стать основой для разработки более эффективных диагностических методов ведения пациентов с АИТ.

В ходе исследовательской работы была отработана методика выделения ТГ и ТПО-специфичных В- лимфоцитов из ткани ЩЖ, подобраны антигены и условия окрашивания клеток биотинилированными комплексами антигенов и стрептовидина, для эффективной детекции данной группы клеток. Доля аутореактивных к ТГ В- лимфоцитов и аутореактивных к ТПО В- лимфоцитов в проанализированных образцах ЩЖ у лиц с повышенными титрами АТ к ТПО и/или АТ к ТГ составила 0,01% и 0,02% соответственно. В образцах ткани ЩЖ условно здоровых лиц аутореактивных В- лимфоцитов не выявлено. Различий содержания аутоспецифичных В- лимфоцитов в группах «носителей» АТ к ТПО и пациентов с гипотиреозом не выявлено. Проведенные эксперименты являются

подготовительным этапом для дальнейших исследований, посвященные изучению молекулярных структур аутоантител аутоспецифичных В- лимфоцитов, для более глубокого понимания механизмов аутоиммунных процессов, происходящих в тканях ЩЖ. Фундаментальные исследования позволят определить ключевые молекулярные механизмы, которые могут стать основой для разработки более эффективных диагностических методов ведения пациентов с АИТ.

## ВЫВОДЫ

- 1) Распространённость «носительства» антител к тиреопероксидазе у лиц старше 18 лет, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита, составила 25%, 95% ДИ (21%; 28%).
- 2) Распространённость сочетания (много) узлового зоба и хронического аутоиммунного тиреоидита у лиц старше 18 лет, проживающих в условиях лёгкого йодного дефицита, составила 13%, 95% ДИ (10%; 16%).
- 3) Установлена ассоциация между высокой частотой деторождения ( $\geq 3$  детей), наличием «носительства» антител к тиреопероксидазе. Статистической связи между наличием антител к тиреопероксидазе и узловым (многоузловым) зобом не получено.
- 4) Различий в содержании В- регуляторных клеток у условно здоровых лиц, бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе аутоиммунного тиреоидита (как изолированного, так и в составе аутоиммунных полигландулярных синдромов) не выявлено. Тенденция к снижению содержанию Т-регуляторных клеток и В-регуляторных клеток памяти может являться предиктором развития или маркером аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите вследствие нарушения периферической иммунной толерантности. «Носительство» антител к тиреопероксидазе не сопровождается активацией IL-10 продуцирующих В клеток памяти под действием неспецифических активаторов.
- 5) Различий в содержании Т-хелперов 1, 2 и 17 типов в группах «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного аутоиммунного тиреоидита и с аутоиммунным тиреоидитом в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома и условно здоровых лиц не выявлено. «Носительство» антител к тиреопероксидазе не сопровождается активацией Th1/Th2-опосредованного иммунного ответа, под действием неспецифических активаторов.
- 6) Для бессимптомных «носителей» аутоантител к антигенам щитовидной железы, пациентов с гипотиреозом в исходе изолированного аутоиммунного тиреоидита и преимущественно в группе лиц с аутоиммунным тиреоидитом в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома характерно снижение IL-10 продуцирующих В- регуляторных лимфоцитов при культивировании клеток *in vitro*.
- 7) Доля аутореактивных к тиреоглобулину В- лимфоцитов и аутореактивных к тиреопероксидазе В- лимфоцитов в 10 проанализированных образцах щитовидной

железы у лиц с повышенными титрами антител к тиреопероксидазе и/или антител к тиреоглобулину составила 0,01% и 0,02% соответственно. В 2 образцах ткани щитовидной железы условно здоровых лиц аутореактивных В- лимфоцитов не выявлено.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Женщины с высокой частотой деторождения (3 ребенка и более), проживающие в условиях дефицита йода, формируют группу риска развития сочетанных йододефицитных и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Целесообразно рекомендовать им йодную профилактику на постоянной основе, обязательное пальпаторное исследование щитовидной железы на диспансерном этапе и определение уровня антител к тиреопероксидазе и тиреотропного гормона при подготовке к последующей беременности.
2. Запатентованные базы данных *«Результаты антропометрического, гормонального и иммунологического обследований населения Чеченской Республики, как йододефицитного региона»* и *«Результаты антропометрического, гормонального, иммунологического и инструментального обследований населения Тульской области, как йододефицитного региона»* могут быть использованы в ходе проведения контрольных исследований, направленных на уточнение эффективности йодной профилактики в контексте распространенности сочетанных заболеваний щитовидной железы на региональном уровне ( Тульская область и Чеченская Республика) при условии внедрения региональных профилактических программ.
3. Снижение IL10-продуцирующих В- регуляторных лимфоцитов можно рассматривать как предиктор развития аутоиммунного процесса в щитовидной железе.
4. Для максимально эффективной детекции специфичных к тиреоглобулину и тиреопероксидазе В- лимфоцитов рекомендовано использовать комплексы биотинилированных аутоантигенов с флуоресцентно-меченными конъюгатами стрептавилина: TG-bio16 и стрептавидина (PE/Cy5) в соотношении 1:1 и ТРО-bio4 и стрептавидина (PE/Cy5) в молярных соотношениях 1:1. Для детекции специфичных к тиреопероксидазе В- лимфоцитов рекомендовано использовать рекомбинантную тиреопероксидазу, синтезированную в эукариотической системе экспрессии.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИЗ- аутоиммунные заболевания  
АИТ- аутоиммунный тиреоидит  
АПК- антиген-презентирующие клетки  
АПС- аутоиммунный полигландулярный синдром  
АТ- антитела  
АТ к ТГ- антитела к тиреоглобулину  
АТ к ТПО- антитела к тиреопероксидазе  
АТ к рТТГ- антитела к рецептору ТТГ  
БГ- болезнь Грейвса  
РА- ревматоидный артрит  
РЩЖ- рак щитовидной железы  
СД- сахарный диабет  
СКВ- системная красная волчанка  
Т4- тироксин  
Т3- трийодтиронин  
ТГ- тиреоглобулин  
ТТГ- тиреотропный гормон  
ТПО- тиреопероксидаза  
ХГЧ- хорионический гонадотропин  
ЩЖ- щитовидная железа  
Breg- В-регуляторные лимфоциты  
NK- клетки-натуральные киллеры (естественные киллеры)  
NIS- симпортер Na/I  
NOD- non-obese diabetic  
МНС- главный комплекс гистосовместимости  
HLA- человеческий лейкоцитарный антиген  
IL- интерлейкин  
IFN- $\gamma$ - интерферон гамма  
TNF- $\alpha$ - фактор некроза опухоли альфа  
TNF- $\beta$ - фактор некроза опухоли бета  
Th1- Т- лимфоциты хелперы 1 типа  
Th2- Т- лимфоциты хелперы 2 типа  
Th17- Т- лимфоциты хелперы 17 типа  
Treg- Т-регуляторные лимфоциты

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Conrad N. et al. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK // *The Lancet*. Elsevier, 2023. Vol. 401, № 10391. P. 1878–1890.
2. Miller F.W. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention // *Curr Opin Immunol*. Elsevier Current Trends, 2023. Vol. 80. P. 102266.
3. Hu X. et al. Global prevalence and epidemiological trends of Hashimoto's thyroiditis in adults: A systematic review and meta-analysis // *Front Public Health*. Front Public Health, 2022. Vol. 10.
4. На правах рукописи Фадеев Валентин Викторович/ Йододефицитные и аутоиммунные заболевания щитовидной железы в регионе лёгкого йодного дефицита.
5. Дмитриева Р.О. et al. Уровни антител к тиреоидной пероксидазе в зависимости от пола и возраста в подборке мужчин и женщин 25-69 лет Новосибирска (эпидемиологическое исследование) // *Сибирский научный медицинский журнал*. Федеральное государственное унитарное предприятие «Издательство Сибирского отделения Российской академии наук», 2009. № 3.
6. McLeod D.S.A., Cooper D.S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity // *Endocrine*. Humana Press Inc., 2012. Vol. 42, № 2. P. 252–265.
7. Hollowell J.G. et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) // *J Clin Endocrinol Metab*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. Vol. 87, № 2. P. 489–499.
8. Chaker L. et al. Hypothyroidism // *The Lancet*. 2017. Vol. 390, № 10101. P. 1550–1562.
9. Boelaert K. et al. Prevalence and Relative Risk of Other Autoimmune Diseases in Subjects with Autoimmune Thyroid Disease // *American Journal of Medicine*. 2010. Vol. 123, № 2.
10. Fallahi P. et al. The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients // *Autoimmun Rev*. 2016. Vol. 15, № 12. P. 1125–1128.
11. Fallahi P. et al. The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients // *Autoimmun Rev*. Elsevier, 2016. Vol. 15, № 12. P. 1125–1128.
12. Pham-Dobor G. et al. Prevalence of other autoimmune diseases in polyglandular autoimmune syndromes type II and III // *J Endocrinol Invest*. 2020. Vol. 43, № 9. P. 1–9.



13. Nederstigt C. et al. Associated auto-immune disease in type 1 diabetes patients: a systematic review and meta-analysis // *Eur J Endocrinol. Oxford Academic*, 2019. Vol. 180, № 2. P. 135–144.
14. Skov J. et al. Shared etiology of type 1 diabetes and Hashimoto's thyroiditis: a population-based twin study // *Eur J Endocrinol. Bioscientifica Ltd.*, 2022. Vol. 186, № 6. P. 677.
15. Conrad N. et al. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK // *The Lancet. Lancet*, 2023. Vol. 401, № 10391. P. 1878–1890.
16. Belovalova I.M. et al. Tobacco smoking, e-cigarette and thyroid: what are the risks of thyroid disorders // *Clinical and experimental thyroidology*. 2024. Vol. 19, № 2. P. 11–17.
17. user. 2\_10.
18. Wiersinga W.M. Smoking and thyroid // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013. Vol. 79, № 2. P. 145–151.
19. Tweed J.O. et al. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2012. Vol. 23, № 7. P. 334–342.
20. Serrano-Nascimento C., Nunes M.T. Perchlorate, nitrate, and thiocyanate: Environmental relevant NIS-inhibitors pollutants and their impact on thyroid function and human health // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. Vol. 13.
21. Chung J.H. Evaluation of Thyroid Hormone Levels and Urinary Iodine Concentrations in Koreans Based on the Data from Korea National Health and Nutrition Examination Survey VI (2013 to 2015) // *Endocrinology and Metabolism*. 2018. Vol. 33, № 2. P. 160.
22. Troshina E.A., Senyushkina E.S., Terekhova M.A. The role of selenium in the pathogenesis of thyroid disease // *Clinical and experimental thyroidology*. 2019. Vol. 14, № 4. P. 192–205.
23. Wu Q. et al. Low Population Selenium Status Is Associated With Increased Prevalence of Thyroid Disease // *J Clin Endocrinol Metab*. 2015. Vol. 100, № 11. P. 4037–4047.
24. Bülow Pedersen I. et al. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013. Vol. 79, № 4. P. 584–590.
25. Troshina E.A. et al. The study of blood serum trace elements in comparison with the structural and functional characteristics of goiter and the carriage of antithyroid antibodies in some regions of Russia // *Problems of Nutrition*. 2022. Vol. 91, № 6. P. 85–91.
26. Federige M.A.F. et al. Serum selenium and selenoprotein-P levels in autoimmune thyroid diseases patients in a select center: a transversal study // *Arch Endocrinol Metab*. 2017. Vol. 61, № 6. P. 600–607.

27. Wang F. et al. Selenium and thyroid diseases // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023. Vol. 14.
28. Li Y. et al. Effects of Selenium Supplement on B Lymphocyte Activity in Experimental Autoimmune Thyroiditis Rats // *Int J Endocrinol*. 2021. Vol. 2021. P. 1–8.
29. Pigarova E.A., Mazurina N. V., Troshina E.A. Vitamin D in the prevention of bone and metabolic disorders // *Consilium Medicum*. 2019. Vol. 21, № 4. P. 84–90.
30. Taheriniya S. et al. Vitamin D and thyroid disorders: a systematic review and Meta-analysis of observational studies // *BMC Endocr Disord*. 2021. Vol. 21, № 1. P. 171.
31. Štefanić M., Tokić S. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to Hashimoto's thyroiditis: a systematic review, meta-analysis and meta-regression of observational studies // *Eur J Nutr*. 2020. Vol. 59, № 3. P. 859–872.
32. Evliyaoğlu O. et al. Vitamin D Deficiency and Hashimoto's Thyroiditis in Children and Adolescents: a Critical Vitamin D Level for This Association? // *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2015. Vol. 7, № 2. P. 128–133.
33. De Pergola G. et al. Low 25 Hydroxyvitamin D Levels are Independently Associated with Autoimmune Thyroiditis in a Cohort of Apparently Healthy Overweight and Obese Subjects // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018. Vol. 18, № 6. P. 646–652.
34. D'Aurizio F. et al. Is vitamin D a player or not in the pathophysiology of autoimmune thyroid diseases? // *Autoimmun Rev*. 2015. Vol. 14, № 5. P. 363–369.
35. Cvek M. et al. Vitamin D and Hashimoto's Thyroiditis: Observations from CROHT Biobank // *Nutrients*. 2021. Vol. 13, № 8. P. 2793.
36. Taheriniya S. et al. Vitamin D and thyroid disorders: a systematic review and Meta-analysis of observational studies // *BMC Endocr Disord*. 2021. Vol. 21, № 1. P. 171.
37. Hahn J. et al. Vitamin D and marine omega 3 fatty acid supplementation and incident autoimmune disease: VITAL randomized controlled trial // *BMJ*. 2022. P. e066452.
38. Botelho I.M.B. et al. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status // *Endocr J*. 2018. Vol. 65, № 10. P. 1029–1037.
39. Bscheider M., Butcher E.C. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells // *Immunology*. 2016. Vol. 148, № 3. P. 227–236.
40. Cyprian F. et al. Immunomodulatory Effects of Vitamin D in Pregnancy and Beyond // *Front Immunol*. 2019. Vol. 10.
41. Rolf L. et al. Illuminating vitamin D effects on B cells – the multiple sclerosis perspective // *Immunology*. 2016. Vol. 147, № 3. P. 275–284.
42. Zhao R. et al. Immunomodulatory Function of Vitamin D and Its Role in Autoimmune Thyroid Disease // *Front Immunol*. 2021. Vol. 12.

43. Pedersen I.B. et al. A cautious iodization programme bringing iodine intake to a low recommended level is associated with an increase in the prevalence of thyroid autoantibodies in the population // Clin Endocrinol (Oxf). Clin Endocrinol (Oxf), 2011. Vol. 75, № 1. P. 120–126.
44. Vanderpump M. Thyroid autoimmunity following an iodization programme\* // Clin Endocrinol (Oxf). Clin Endocrinol (Oxf), 2011. Vol. 75, № 1. P. 10–11.
45. Teng X. et al. More than adequate iodine intake may increase subclinical hypothyroidism and autoimmune thyroiditis: a cross-sectional study based on two Chinese communities with different iodine intake levels // Eur J Endocrinol. Eur J Endocrinol, 2011. Vol. 164, № 6. P. 943–950.
46. Li Y. et al. Antithyroperoxidase and Antithyroglobulin Antibodies in a Five-Year Follow-Up Survey of Populations with Different Iodine Intakes // J Clin Endocrinol Metab. Oxford Academic, 2008. Vol. 93, № 5. P. 1751–1757.
47. Fadeev V. V., Mel'nichenko G.A. Physiological doses of iodine and carriage of antibodies; thyroid peroxidase: an open, randomized trial // Problems of Endocrinology. 2004. Vol. 50, № 5. P. 3–7.
48. Фадеев В.В. М.Г.А., Г.Г.А. Аутоиммунный тиреоидит. Первый шаг к консенсусу // Проблемы Эндокринологии. 2001. P. 7–13.
49. Абдулхабирова Ф.М. Профилактика йододефицитных состояний и аутоиммунный заболевания щитовидной железы // Consilium Medicum. 2014.
50. Korevaar T.I.M. et al. Thyroid Autoimmunity Impairs the Thyroidal Response to Human Chorionic Gonadotropin: Two Population-Based Prospective Cohort Studies // J Clin Endocrinol Metab. J Clin Endocrinol Metab, 2017. Vol. 102, № 1. P. 69–77.
51. Hou Y. et al. Different Thyroidal Responses to Human Chorionic Gonadotropin Under Different Thyroid Peroxidase Antibody and/or Thyroglobulin Antibody Positivity Conditions During the First Half of Pregnancy // Thyroid. 2019. Vol. 29, № 4. P. 577–585.
52. Shah N.M. et al. Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor // Front Endocrinol (Lausanne). 2019. Vol. 10.
53. Adams K.M., Nelson J.L. Microchimerism // JAMA. 2004. Vol. 291, № 9. P. 1127.
54. Klintschar M. et al. Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach // Eur J Endocrinol. 2006. Vol. 154, № 2. P. 237–241.
55. Srivatsa B. et al. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study // The Lancet. 2001. Vol. 358, № 9298. P. 2034–2038.
56. Fugazzola L., Cirello V., Beck-Peccoz P. Microchimerism and Endocrine Disorders // J Clin Endocrinol Metab. 2012. Vol. 97, № 5. P. 1452–1461.

57. Ключкина Л.А. Гормональная контрацепция у женщин репродуктивного возраста с аутоиммунным тиреоидитом // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. 2017. Vol. 2.
58. Маринкин И.О. С.Т.М., М.К.Ю., У.А.В., Д.Е.А. Влияние гормональной контрацепции у женщин на течение аутоиммунного тиреоидита" // Journal of Siberian Medical Sciences. 2015. Vol. 3. P. 56.
59. Tomer Y., Davies T.F. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function // Endocr Rev. Endocr Rev, 2003. Vol. 24, № 5. P. 694–717.
60. Antonelli A. et al. Autoimmune thyroid disorders // Autoimmun Rev. Autoimmun Rev, 2015. Vol. 14, № 2. P. 174–180.
61. Simmonds M.J. GWAS in autoimmune thyroid disease: redefining our understanding of pathogenesis // Nat Rev Endocrinol. Nat Rev Endocrinol, 2013. Vol. 9, № 5. P. 277–287.
62. Liu K. et al. Research progress in the construction of animal models of autoimmune thyroiditis // Autoimmunity. 2024. Vol. 57, № 1.
63. Vargas-Uricoechea H. Molecular Mechanisms in Autoimmune Thyroid Disease // Cells. 2023. Vol. 12, № 6. P. 918.
64. Rodríguez-Muñoz A. et al. Levels of regulatory T cells CD69+NKG2D+IL-10+ are increased in patients with autoimmune thyroid disorders // Endocrine. 2016. Vol. 51, № 3. P. 478–489.
65. McLachlan S.M., Rapoport B. Discoveries in Thyroid Autoimmunity in the Past Century // Thyroid. 2023. Vol. 33, № 3. P. 278–286.
66. Chen C.-R. et al. Antibodies to Thyroid Peroxidase Arise Spontaneously with Age in NOD.H-2h4 Mice and Appear after Thyroglobulin Antibodies // Endocrinology. 2010. Vol. 151, № 9. P. 4583–4593.
67. Eleftheriadou A.-M. et al. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease // Eur J Endocrinol. 2020. Vol. 183, № 6. P. 571–580.
68. Kang S. et al. Advances in regulatory B cells in autoimmune thyroid diseases // Int Immunopharmacol. 2021. Vol. 96. P. 107770.
69. Weetman A.P. The Immunopathogenesis of Chronic Autoimmune Thyroiditis One Century after Hashimoto // Eur Thyroid J. 2012.
70. Lenti M.V. et al. Seronegative autoimmune diseases: A challenging diagnosis // Autoimmun Rev. 2022. Vol. 21, № 9. P. 103143.
71. Zadeh-Vakili A. et al. A systematic review of dysregulated microRNAs in Hashimoto's thyroiditis // Endocrine. 2024. Vol. 84, № 3. P. 800–811.

72. Mortazavi-Jahromi S.S., Aslani M., Mirshafiey A. A comprehensive review on miR-146a molecular mechanisms in a wide spectrum of immune and non-immune inflammatory diseases // *Immunol Lett*. 2020. Vol. 227. P. 8–27.
73. Liu Y. et al. Circulating microRNA Expression Profiling Identifies miR-125a-5p Promoting T Helper 1 Cells Response in the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11.
74. Imam S. et al. Nature of coexisting thyroid autoimmune disease determines success or failure of tumor immunity in thyroid cancer // *J Immunother Cancer*. 2019. Vol. 7, № 1. P. 3.
75. Zimmermann M.B., Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders // *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015. Vol. 3, № 4. P. 286–295.
76. Feldt-Rasmussen U. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor for thyroid cancer // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2020. Vol. 27, № 5. P. 364–371.
77. McLeod D.S.A., Cooper D.S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity // *Endocrine*. 2012. Vol. 42, № 2. P. 252–265.
78. Bjoro T. et al. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trondelag (HUNT) // *Eur J Endocrinol*. 2000. Vol. 143, № 5. P. 639–647.
79. Raber W. et al. Thyroid Ultrasound Versus Antithyroid Peroxidase Antibody Determination: A Cohort Study of Four Hundred Fifty-One Subjects // *Thyroid*. 2002. Vol. 12, № 8. P. 725–731.
80. Carlé A. et al. Thyroid Volume in Hypothyroidism due to Autoimmune Disease Follows a Unimodal Distribution: Evidence against Primary Thyroid Atrophy and Autoimmune Thyroiditis Being Distinct Diseases // *J Clin Endocrinol Metab*. 2009. Vol. 94, № 3. P. 833–839.
81. Bülow Pedersen I. et al. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005. Vol. 62, № 6. P. 713–720.
82. Khosrotehrani K. Transfer of Fetal Cells With Multilineage Potential to Maternal Tissue // *JAMA*. 2004. Vol. 292, № 1. P. 75.
83. Lepez T., Vandewoestyne M., Deforce D. Fetal microchimeric cells in autoimmune thyroid diseases // *Chimerism*. 2013. Vol. 4, № 4. P. 111–118.
84. Nanba T. et al. Increases of the Th1/Th2 Cell Ratio in Severe Hashimoto's Disease and in the Proportion of Th17 Cells in Intractable Graves' Disease // *Thyroid*. 2009. Vol. 19, № 5. P. 495–501.

85. Nodehi M. et al. The Frequency of CD4<sup>+</sup> T Cells in Women with Hashimoto's Thyroiditis // *Int J Endocrinol Metab.* 2021. Vol. 19, № 4.
86. Chen A., Huang L., Zhang L. Helper T Cell 17 and Regulatory T Cell Levels in Peripheral Blood of Newly Diagnosed Patients with Autoimmune Thyroid Disease: A Meta-Analysis // *Hormone and Metabolic Research.* Georg Thieme Verlag, 2023. Vol. 55, № 1. P. 40–50.
87. Liu Y. et al. Th17/Treg Cells Imbalance and GITRL Profile in Patients with Hashimoto's Thyroiditis // *Int J Mol Sci.* 2014. Vol. 15, № 12. P. 21674–21686.
88. Rydzewska M. et al. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases // *Thyroid Res.* 2018. Vol. 11, № 1. P. 2.
89. Santaguida M.G. et al. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases // *Clinical Immunology.* 2017. Vol. 184. P. 42–47.
90. Kristensen B. et al. Characterization of Regulatory B Cells in Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 5. P. e0127949.
91. Capriello S. et al. Regulatory B Cells in Systemic Sclerosis Isolated or Concomitant With Hashimoto Thyroiditis // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13.
92. Santaguida M.G. et al. Breg Cells in Celiac Disease Isolated or Associated to Hashimoto's Thyroiditis // *Int J Endocrinol.* 2018. Vol. 2018. P. 1–6.
93. Feldt-Rasmussen U. et al. Anti-Thyroid Peroxidase Antibodies in Thyroid Disorders and Non-Thyroid Autoimmune Diseases // *Autoimmunity.* 1991. Vol. 9, № 3. P. 245–254.
94. Effraimidis G., Wiersinga W.M. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Autoimmune thyroid disease: old and new players // *Eur J Endocrinol.* 2014. Vol. 170, № 6. P. R241–R252.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Анкета участника

	Анкетные данные		
1	Фамилия		
	Имя		
	Отчество		
2	Пол	Муж	Жен.
3	Возраст (лет)		
4	Дата рождения		
5	Рост		
6	Вес		
7	Курение	Да	Нет
8	Наличие заболеваний щитовидной железы	Да (указать какое)	Нет
9	Наличие сахарного диабета или нарушений гликемии	Да	Нет
10	Прием левотироксина (Эутирокс, L-тироксин) в настоящее время	Да (указать дозу)	Нет
11	Прием других гормональных препаратов в настоящее время	Да (указать какой)	Нет
12	Прием амиодарона (кордарона) ранее или в настоящее время	Да (указать продолжительность приема)	Нет
13	Операции на щитовидной железе	Да	Нет
14	Проводилась ли лучевая терапия по поводу других заболеваний?	Да (указать заболевание)	Нет
15	Проводилась ли химиотерапия по поводу других заболеваний?	Да (указать заболевание)	Нет
16	Наличие заболеваний щитовидной железы у близких родственников (мать, отец)	Да	Нет
17	Наличие вредных факторов труда (токсические производства, ионизирующее облучение)	Да (указать какое)	Нет

	<b>Вопрос</b>		<b>Ответ</b>
1	Используете ли Вы йодированную соль при приготовлении пищи?		Да, всегда (ежедневно)
			Да, иногда (периодически)
			Нет, очень редко
			Нет, никогда
2			Ежедневно
			3 и более раза в неделю

	Как часто Вы употребляете в пищу рыбу и морепродукты (в т.ч. морские водоросли)?	1-2 раза в неделю
		Менее 1 раза в неделю
		Не употребляю
3	Как часто вы употребляете мясо?	Ежедневно
		3 и более раза в неделю
		1-2 раза в неделю
		Менее 1 раза в неделю
		Не употребляю
4	Употребляете ли Вы йод-содержащие препараты или добавки (БАД)?	Да (указать какие и как часто) _____ _____
		Нет
5	Покупаете ли Вы продукты питания, обогащенные йодом и другими микроэлементами (например, хлеб, яйца, молочные продукты, вода и др.)?	Да (указать какие и как часто) _____ _____ _____ _____
		Нет