

## **ВЛИЯНИЕ ХЕЛПЕРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА**

**Савченко А.А.<sup>1,2</sup>, Дудина М.А.<sup>2</sup>, Борисов А.Г.<sup>1,2</sup>, Догадин С.А.<sup>2</sup>,  
Кудрявцев И.В.<sup>3,4</sup>, Мошев А.В.<sup>1</sup>, Маньковский В.А.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Целью исследования явилось сравнительное изучение влияния хелперных (Th-клетки) и регуляторных Т-клеток (Treg) на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы при болезни Грейвса (БГ). Обследовано 43 женщины с болезнью Грейвса. Диагноз БГ основывался на клинико-лабораторных признаках заболевания: жалобах, клинической картине тиреотоксикоза при объективном осмотре, характерных сонографических изменениях ЩЖ, а также повышенном титре антител к рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови и соответствующих изменениях тиреоидного статуса. В качестве контроля обследовано 67 практически здоровых женщин. Исследование фенотипа Th-клеток, Treg и В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции, соответственно, цельной периферической крови и лимфоцитов, выделенных из ткани щитовидной железы. При исследовании влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов обнаружено, что при БГ в крови снижено количество Treg. В ткани щитовидной железы относительное количество Treg у больных БГ соответствует их уровню в крови. Изменений содержания Т-хелперов в крови, экспрессирующих и не экспрессирующих CD25-рецептор, по сравнению с контрольными значениями не обнаружено. У больных БГ в периферической крови повышено содержание В1-клеток. В ткани щитовидной железы процентное количество данной субпопуляции В-лимфоцитов снижено относительно уровня, выявленного в крови, но при повышении содержания В-клеток памяти. Количество активированных В-лимфоцитов (по CD23-маркеру) в крови у больных БГ снижено относительно контрольных значений. В ткани щитовидной железы обнаружено еще более выраженное снижение относительного количества активированных В-клеток по сравнению с уровнем, выявленным у больных аутоиммунным заболеванием в крови. С помощью корреляционного анализа установлено, что если у лиц контрольной группы повышение содержания активиро-

### **Адрес для переписки:**

Кудрявцев Игорь Владимирович  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12.  
Тел.: 8 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Kudryavtsev Igor V.  
Research Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str.,  
12.  
Phone: 7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

А.А. Савченко, М.А. Дудина, А.Г. Борисов, С.А. Догадин, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев, В.А. Маньковский «Влияние хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и щитовидной железы при болезни Грейвса» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 431–438. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

© Савченко А.А. и соавт., 2018

### **For citation:**

A.A. Savchenko, M.A. Dudina, A.G. Borisov, S.A. Dogadin, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev, V.A. Mankovskiy "Effects of helper and regulatory cells upon phenotypic composition of blood B lymphocytes and thyroid gland in Graves' disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 431–438. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

ванных В-лимфоцитов в крови сопровождается сонаправленной реакцией со стороны Тreg (обычный иммунорегуляторный процесс), то при БГ подобный механизм нарушается. В крови у обследованных больных количество Тreg и активированных Т-хелперов положительно взаимосвязано с общими В-лимфоцитами, В2-клетками и наивными В-лимфоцитами, тогда как в ткани щитовидной железы Тreg полностью исключены из системы взаимосвязей с активированными В-лимфоцитами. Предполагается, что у больных БГ наблюдается не только снижение содержания Тreg в крови, но и нарушение их функциональной активности.

**Ключевые слова:** Т-регуляторные клетки, Т-хелперы, В-лимфоциты, субпопуляция, кровь, ткань щитовидной железы, болезнь Грейвса

## EFFECTS OF HELPER AND REGULATORY CELLS UPON PHENOTYPIC COMPOSITION OF BLOOD B LYMPHOCYTES AND THYROID GLAND IN GRAVES' DISEASE

Savchenko A.A.<sup>a,b</sup>, Dudina M.A.<sup>b</sup>, Borisov A.G.<sup>a,b</sup>, Dogadin S.A.<sup>b</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>c,d</sup>, Moshev A.V.<sup>a</sup>, Mankovskiy V.A.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Krasnoyarsk Research Center, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>e</sup> Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** The aim of this work was a comparative study of the helper- (Th cells) and regulatory T cells (Treg) effects upon the phenotypic composition of B lymphocytes in blood and thyroid tissue in Graves' disease (GD). 43 women with GD were examined. The diagnosis of GD was based on clinical and laboratory signs of the disease: complaints, clinical picture of the thyrotoxicosis with objective examination, characteristic sonographic changes in thyroid gland, as well as elevated titers of antibodies to thyroid-stimulating hormone receptor in blood serum, and corresponding changes in thyroid status. 67 practically healthy women were examined as a control. The studies of Th cells, Treg and B lymphocytes phenotypes in blood and thyroid tissue were carried out by flow cytometry using direct immunofluorescence, respectively, in whole peripheral blood and lymphocytes isolated from thyroid tissue. The relative amounts of Tregs in thyroid gland from the patients with GD corresponds to their level in the blood. We did not find any changes in the content of blood T helpers expressing vs. non-expressing CD25 receptors, as compared to the control values. In patients with GD, an increased B1 cells content was revealed in peripheral blood. The percentage of this B cell subpopulation in thyroid tissue is reduced when compared to the levels found in blood, but with increased memory B cells contents. The number of activated B lymphocytes (by CD23 marker) in blood of patients with GD is reduced when compared to control values. It was found that, in thyroid tissue, there is an even more pronounced decrease in the relative amount of activated B cells compared to the levels detected in blood from these patients. By means of correlation analysis, it was found that increase in activated B lymphocytes in blood from controls is accompanied by a co-directional reaction from Treg (the usual immunoregulatory process). In Graves' disease, such a relationship was not found. The amounts of Treg and activated T helper cells in blood of the patients did positively correlate with common B lymphocytes, B2 cells and naïve B lymphocytes. Meanwhile, Treg's in thyroid tissue, were completely excluded from the system of interactions with activated B lymphocytes. It is assumed that a decrease in Treg's content in peripheral blood, along with altered functional activity is observed in patients with GD.

**Keywords:** T regulatory cells, T helpers, B lymphocytes, subpopulation, blood, thyroid tissue, Graves' disease

## Введение

Болезнь Грейвса (БГ) представляет собой органоспецифическое аутоиммунное заболевание щитовидной железы (ЩЖ), характеризующее-

ся развитием диффузного гиперпластического зоба и обусловленное стимуляцией рецепторов к тиреотропному гормону (ТТГ) тиреостимулирующими антителами [3, 13]. Иммунопатогенез БГ определяется выработкой В-лимфоцитами

тиреоидстимулирующих аутоантител, действующих подобно ТТГ и вызывающих гиперфункцию и пролиферацию тиреоцитов. Между тем, эффективность традиционной консервативной терапии БГ в настоящее время определяется восстановлением функции ЩЖ (за счет тиреостатической терапии), а не подавлением интенсивности аутоиммунного процесса. В то же время даже при успешном восстановлении концентрации тиреоидных гормонов в крови, у больных БГ нередко наблюдаются рецидивы заболевания, лечение которых осуществляется же хирургическими или радиотерапевтическими методами [1, 13]. Следовательно, для разработки специфической (таргетной) терапии, направленной на подавление аутоиммунного процесса при БГ, необходимо охарактеризовать внутрисистемные механизмы регуляции функции В-лимфоцитов.

Функциональная активность В-лимфоцитов в значительной степени регулируется Т-клетками. Классическим определением механизмов данной регуляции является участие Т-хелперов 2-го типа в активации В-лимфоцитов и стимуляции выработки ими иммуноглобулинов различных классов. Установлено, что при БГ наблюдается патогенетически значимый дисбаланс Th1-/Th2-лимфоцитов [5]. Доказано, что Th22-клетки, экспрессирующие и секретирующие интерлейкин-22, принимают участие в иммунопатогенезе различных аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, включая БГ [11, 14].

Одним из основных внутрисистемных механизмов предотвращения и ингибирования аутоиммунных процессов является супрессия функциональной активности эффекторных клеток и Т-хелперов. В связи с этим при исследовании иммунопатогенеза БГ активно обсуждается роль регуляторных Т-клеток (Treg). Обнаружено, что при БГ количество Treg в крови снижается [10, 15]. При проведении тиреостатической терапии и нормализации концентрации тиреоидных гормонов количество Treg в периферической крови больных повышается [6, 7]. Однако механизмы Т-хелперной и регуляторной регуляции функциональной активности В-лимфоцитов при БГ раскрыты до сих пор не полностью. В связи с тем что в основе БГ лежит органоспецифический аутоиммунный процесс, механизмы регуляции В-лимфоцитов должны быть охарактеризованы в сравнительном аспекте – в крови и ткани ЩЖ.

Таким образом, **целью данного исследования** явилось сравнительное изучение влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани ЩЖ при БГ.

## Материалы и методы

В исследование было включено 43 женщины с БГ в возрасте от 25 до 76 лет, средний воз-

раст  $39,95 \pm 14,38$ , из них 13 (30,23%) с впервые верифицированным диагнозом и 30 (69,76%) с рецидивом заболевания. Диагноз БГ основывался на клинико-лабораторных признаках заболевания: жалобах, клинической картине тиреотоксикоза при объективном осмотре, характерных сонографических изменениях ЩЖ, а также повышенном титре антител к рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови и соответствующих изменениях тиреоидного статуса. Определение гормонов в крови проводилось в гормональной лаборатории эндокринологического центра Красноярской краевой клинической больницы. После достижения медикаментозного эутиреоза всем больным проводилась эпифасциальная тиреоидэктомия. Часть удаленной ЩЖ погружалась в пластиковый контейнер с изотоническим раствором натрия хлорида для последующего выделения из ткани лимфоцитов. В качестве контроля обследовано 67 практически здоровых женщин аналогичного возраста, без отягощенного анамнеза по заболеваниям ЩЖ у себя и кровных родственников, а также отсутствием структурных изменений ЩЖ при УЗИ. Критериями исключения из контрольной группы являлись беременность и период лактации. В течение 2-х месяцев, предшествующих иммунологическому и гормональному анализу, обследованные женщины не болели острыми респираторно-вирусными инфекциями и не получали профилактических прививок.

Исследование фенотипа Th-клеток, Treg и В-лимфоцитов крови и ткани ЩЖ проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции, соответственно, цельной периферической крови и лимфоцитов, выделенных из ткани ЩЖ, с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. Лимфоциты из ткани ЩЖ получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) ( $\rho = 1,077$ ) клеточной суспензии, полученной путем мягкого механического выдавливания клеток из фрагментированной ткани ЩЖ. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием

реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий в содержании лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ у больных БГ определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

## Результаты

При исследовании содержания  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD4^+CD25^+$  клеток обнаружено, что их количество в периферической крови больных БГ соответствует контрольным значениям (табл. 1). Кроме того, подобное же процентное содержание данных фракций Т-лимфоцитов выявля-

ется при БГ и в ткани ЩЖ. В то же время уровень  $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$  клеток в крови у больных БГ снижен по сравнению с контрольными значениями. Процентное количество лимфоцитов с данным фенотипом в ткани щитовидной железы при БГ соответствует их уровню в крови.

Исследование субпопуляционного состава В-лимфоцитов позволило установить, что у больных БГ в периферической крови по сравнению с контрольными значениями в 1,6 раза повышено относительное количество  $CD19^+CD5^+$  клеток (табл. 2). В то же время в ткани ЩЖ при БГ количество данной субпопуляции В-клеток снижено в 2,3 раза по сравнению с выявленным у пациентов в периферической крови. Особенностью субпопуляционного состава В-лимфоцитов в ткани при БГ также является увеличение в 1,6 раза по сравнению с уровнем, выявленным в крови, количества  $CD19^+CD27^+$  клеток.

У больных БГ в периферической крови более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями понижено процентное содержание  $CD19^+CD23^+$  клеток (табл. 3). В ткани ЩЖ количество клеток с данным фенотипом у больных БГ еще снижено практически в 2 раза по сравнению с уровнем, выявленным в периферической крови. Кроме того, у больных БГ в крови по сравнению с контролем понижено относительное содержание  $CD19^+CD5^+CD23^+$ ,  $CD19^+CD27^+CD23^+$  и  $CD19^+CD27^+CD23^+$  лимфоцитов. В ткани ЩЖ относительно выявленного в периферической крови у пациентов с БГ снижены уровни  $CD19^+CD5^+CD23^+$ ,  $CD19^+CD27^+CD23^+$  и  $CD19^+CD27^+CD23^+$  клеток.

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Th- И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

**TABLE 1. CONTENT OF THE Th AND T REGULATORY CELLS IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

| Показатели<br>Parameters               | Контроль<br>Control<br>n = 67 |                         | Пациенты с болезнью Грейвса<br>Patients with Grave's disease<br>n = 43 |                         |                                 |                         |
|--|-------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|  |                               |                         | В крови<br>In blood  |                         | В ткани ЩЖ<br>In thyroid glands |                         |
|  | 1                             |                         | 2  |                         | 3                               |                         |
|  | Me                            | $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ | Me   | $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ | Me                              | $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ |
| $CD3^+CD4^+$ , $10^9/L$                | 0,82                          | 0,57-1,14               | 1,01   | 0,65-1,36               |                                 |                         |
| $CD3^+CD4^+$ , %                       | 42,0                          | 35,0-47,4               | 46,5   | 38,4-54,6               | 38,5                            | 31,7-51,9               |
| $CD3^+CD4^+CD25^+$ , %                 | 2,5                           | 2,1-3,4                 | 2,9  | 1,6-4,5                 | 1,6                             | 1,1-9,2                 |
| $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ , % | 1,8                           | 1,5-2,1                 | 1,1  | 0,7-1,6                 | 0,9                             | 0,7-1,3                 |
|  |                               |                         |  | $p_1 = 0,025$           |                                 |                         |

**Примечание.**  $p_1$  – статистически значимые различия с контрольными показателями.

Note.  $p_1$ , statistically significant differences against control parameters

С помощью корреляционного анализа исследованы взаимосвязи между содержанием различных фракций CD4<sup>+</sup> клеток и фенотипическим составом В-лимфоцитов. Обнаруже-

но, что у лиц контрольной группы количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> клеток в крови положительно взаимосвязано с содержанием CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> ( $r=0,29, p=0,032$ ), CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>

**ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me, Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. SUBPOPULATION COMPOSITION OF B CELLS IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me, Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

| Показатели<br>Parameters                | Контроль<br>Control<br>n = 67 |                                      | Пациенты с болезнью Грейвса<br>Patients with Grave's disease<br>n = 43 |                                      |                                 |                                      |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
|   |                               |                                      | В крови<br>In blood  |                                      | В ткани ЩЖ<br>In thyroid glands |                                      |
|   | 1                             |                                      | 2  |                                      | 3                               |                                      |
|   | Me                            | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> | Me   | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> | Me                              | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> |
| CD19 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L  | 0,26                          | 0,18-0,34                            | 0,27   | 0,17-0,37                            |                                 |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> , %                   | 12,9                          | 9,2-16,0                             | 12,9   | 9,6-17,6                             | 15,1                            | 13,4-26,0                            |
| CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> , %  | 10,1                          | 7,7-12,5                             | 10,5   | 7,4-14,2                             | 13,63                           | 10,6-26,1                            |
| CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> , %  | 1,6                           | 1,2-2,8                              | 2,5  | 1,8-3,8                              | 1,1                             | 0,2-1,8                              |
|   |                               |                                      | p <sub>1</sub> = 0,002   |                                      | p <sub>2</sub> = 0,023          |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> , % | 9,4                           | 7,5-12,0                             | 9,9  | 7,0-15,0                             | 9,7                             | 5,7-14,1                             |
| CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> , % | 2,4                           | 1,8-3,2                              | 2,3  | 1,3-3,5                              | 3,7                             | 2,5-6,2                              |
|   |                               |                                      |  |                                      | p <sub>2</sub> = 0,028          |                                      |

Примечание. p<sub>1</sub> – статистически значимые различия с контрольными показателями; p<sub>2</sub> – -/- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Note. p<sub>1</sub> – the differences between blood samples from control group and patients with Graves' disease are significant; p<sub>2</sub> – the differences between blood samples and thyroid tissue infiltrated cells from patients with Graves' disease are significant.

**ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ (В %), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НИЗКОАФФИННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ IgE, В КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me, Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 3. CONTENT OF B LYMPHOCYTE (IN %) WITH EXPRESSION OF THE LOW AFFINITY RECEPTOR FOR IgE IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me, Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

| Показатели<br>Parameters                              | Контроль<br>Control<br>n = 67 |                                      | Пациенты с болезнью Грейвса<br>Patients with Grave's disease<br>n = 43 |                                      |                                 |                                      |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
|   |                               |                                      | В крови<br>In blood  |                                      | В ткани ЩЖ<br>In thyroid glands |                                      |
|   | 1                             |                                      | 2  |                                      | 3                               |                                      |
|   | Me                            | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> | Me   | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> | Me                              | Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> |
| CD19 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup>                   | 10,5                          | 6,9-12,9                             | 5,1  | 2,5-7,7                              | 2,6                             | 1,3-5,3                              |
|   |                               |                                      | p <sub>1</sub> < 0,001   |                                      | p <sub>2</sub> = 0,045          |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>+</sup>  | 8,6                           | 5,3-11,5                             | 3,7  | 1,8-5,3                              | 2,3                             | 1,0-3,7                              |
|   |                               |                                      | p <sub>1</sub> < 0,001   |                                      |                                 |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup>  | 1,4                           | 0,8-2,5                              | 1,3  | 0,5-2,6                              | 0,31                            | 0,18-1,11                            |
|   |                               |                                      |  |                                      | p <sub>2</sub> = 0,040          |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD23 <sup>+</sup> | 8,1                           | 5,4-11,0                             | 2,0  | 1,1-4,3                              | 0,93                            | 0,01-1,09                            |
|   |                               |                                      | p <sub>1</sub> < 0,001   |                                      | p <sub>2</sub> = 0,028          |                                      |
| CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> | 1,4                           | 0,3-2,3                              | 0,24   | 0,14-0,53                            | 0,76                            | 0,32-2,34                            |
|   |                               |                                      | p <sub>1</sub> < 0,001   |                                      | p <sub>2</sub> = 0,038          |                                      |

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

( $r = 0,31$ ,  $p = 0,014$ ),  $CD19^+CD27^+CD23^+$  ( $r = 0,35$ ,  $p = 0,005$ ) и  $CD19^+CD27^+CD23^+$  лимфоцитов ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,001$ ).

У больных БГ относительное количество  $CD19^+$  лимфоцитов в крови положительно коррелирует с процентными уровнями  $CD3^+CD4^+CD25^+$  ( $r = 0,43$ ,  $p = 0,002$ ) и  $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$  клеток ( $r = 0,39$ ,  $p = 0,009$ ). Взаимосвязи в крови также формируются корреляциями количества  $CD19^+CD27^+$  и  $CD19^+CD5$  лимфоцитов с уровнями  $CD3^+CD4^+CD25^+$  ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,001$  и  $r = 0,42$ ,  $p = 0,003$  соответственно) и  $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$  клеток ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,001$  и  $r = 0,37$ ,  $p = 0,012$  соответственно).

У больных БГ относительное количество  $CD3^+CD4^+$  клеток в ткани ЩЖ коррелирует с уровнем  $CD19^+CD5^+CD23^+$  лимфоцитов ( $r = 0,79$ ,  $p = 0,036$ ), тогда как количество  $CD3^+CD4^+CD25^+$  клеток взаимосвязано с процентным содержанием в ткани ЩЖ  $CD19^+CD23^+$  ( $r = 0,85$ ,  $p = 0,014$ ),  $CD19^+CD5^+CD23^+$  ( $r = 0,80$ ,  $p = 0,034$ ),  $CD19^+CD5^+CD23^+$  ( $r = 0,93$ ,  $p = 0,025$ ) и  $CD19^+CD27^+CD23^+$  лимфоцитов ( $r = 0,82$ ,  $p = 0,023$ ).

## Обсуждение

Т-регуляторные клетки ( $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ ) являются одним из основных механизмов контроля развития гипериммунных состояний, включая аутоиммунные заболевания. В связи с этим в ряде работ показано, что при БГ количество Treg в крови у больных снижается. Так, в исследованиях Pawlowska P. и соавт. (2017) установлено, что у больных БГ по сравнению с больными с узловым зобом в 4 раза снижено количество Treg в крови [10]. Стимуляция функциональной активности мононуклеарных клеток инсулинзависимым фактором роста-1 (IGF-1) приводило к повышению количества Treg в крови. Yuan Q. и соавт. (2017) отмечают, что патогенез БГ ассоциирован со сниженным количеством Treg [15]. В нашем исследовании мы также обнаружили, что количество Treg в крови у больных БГ снижено относительно контрольных значений. Уровень Treg в ткани щитовидной железы при данном аутоиммунном заболевании соответствует их содержанию в крови.

Ключевым в иммунопатогенезе БГ является появление на периферии «запрещенного» клона В-лимфоцитов, который способен синтезировать тиреоидстимулирующие антитела. В частности, в работе Kurozumi A. и соавт. (2015) показано, что выключение функционирования В-лимфоцитов приводит к резкому снижению уровня аутоантител и улучшению функции щитовидной железы [8].

При исследовании субпопуляционного состава В-лимфоцитов в крови обнаружено, что при БГ повышается количество В1-клеток. Однако в ткани щитовидной железы у больных БГ содержание В1-лимфоцитов снижено в 2,3 раза по сравнению с уровнем, выявленным в крови, но в 1,6 раза повышено содержание В-клеток памяти. В1-лимфоциты являются минорной фракцией В-клеток, локализуются преимущественно в брюшной и плевральной полостях, синтезируют IgM и IgA к бактериальным антигенам. Однако данная субпопуляция В-лимфоцитов также способна выполнять роль антигенпрезентирующих клеток. Повышение количества В-клеток памяти в ткани щитовидной железы при БГ ранее уже описывалось [12].

Экспрессия CD23-антигена была нами исследована в качестве функционального маркера В-лимфоцитов. Данная молекула представляет собой низкоаффинный рецептор к IgE [4]. Обнаружено, что в крови больных БГ значительно снижено содержание общих В-лимфоцитов, а также В2-клеток, наивных В-лимфоцитов и В-клеток памяти, экспрессирующих CD23. При этом в ткани щитовидной железы у больных данной категории также понижено количество общих В-лимфоцитов, В1-клеток, наивных В-лимфоцитов, В-клеток памяти, экспрессирующих CD23-рецептор, по сравнению с уровнями в крови.

С помощью корреляционного анализа мы оценили влияние Th-клеток и Treg на фенотип В-лимфоцитов. Обнаружено, что у лиц контрольной группы Treg положительно взаимосвязаны с количеством активированных В-лимфоцитов, включая В1-клетки, наивные и В-лимфоциты памяти. Данные взаимосвязи характеризуют обычный иммунорегуляторный процесс, который развивается при увеличении количества активированных В-лимфоцитов. У больных БГ в крови с уровнем В-лимфоцитов положительно взаимосвязаны как активированные Th-клетки, так и Treg. Причем корреляционная связь Т-лимфоцитов при аутоиммунной патологии реализуется только в отношении В-лимфоцитов (общие В-лимфоциты, В2-клетки и наивные В-лимфоциты), не экспрессирующих CD23-маркер. В то же время в ткани щитовидной железы в системе корреляционных связей участвуют только активированные В-лимфоциты (общие В-клетки, В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти) с одной стороны и Т-хелперы, экспрессирующие и не экспрессирующие CD25-рецептор, с другой стороны. Следовательно, если у больных БГ в системе корреляционных связей в крови не принимают участие активированные В-лимфоциты, то в ткани щитовидной железы — Treg. Можно предположить, что при БГ изменя-

ется не только количество Трег в крови, но и нарушается их функция. Подобное предположение также выдвигается рядом исследователей [7, 15].

## Заключение

Таким образом, при исследовании влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов обнаружено, что при БГ в крови снижено количество Трег. В ткани щитовидной железы относительное количество Трег у больных БГ соответствует их уровню в крови. Изменений содержания Т-хелперов в крови, экспрессирующих и не экспрессирующих CD25-рецептор, по сравнению с контрольными значениями не обнаружено. У больных БГ в периферической крови повышено содержание В1-клеток, в ткани щитовидной железы процентное количество данной субпопуляции В-лимфоцитов снижено относительно уровня, выявленного в крови, но при повышении содержания В-клеток памяти. Количество активированных В-лимфоцитов (по CD23-маркеру) в крови у больных БГ сниже-

но относительно контрольных значений. В ткани щитовидной железы выявляется еще более выраженное снижение относительного количества активированных В-клеток по сравнению с уровнем, установленным у больных данным аутоиммунным заболеванием в крови. С помощью корреляционного анализа установлено, что если у лиц контрольной группы повышение содержания активированных В-лимфоцитов в крови сопровождается сонаправленной реакцией со стороны Трег (обычный иммунорегуляторный процесс), то при БГ подобный механизм нарушается. В крови у обследованных больных количество Трег и активированных Т-хелперов положительно взаимосвязано с общими В-лимфоцитами, В2-клетками и наивными В-лимфоцитами, тогда как в ткани щитовидной железы Трег полностью исключены из системы взаимосвязей с активированными В-лимфоцитами. Можно предположить, что у больных БГ наблюдается не только снижение содержания Трег в крови, но и нарушение их функциональной активности.

## Список литературы / References

1. Ванушко В.Э., Фадеев В.В. Болезнь Грейвса (клиническая лекция) // Эндокринная хирургия, 2013. № 1. С. 23-33. [Vanushko V.E., Fadeev V.V. Graves' disease (clinical lecture). *Endokrinная khirurgiya = Endocrine Surgery*, 2013, no. 1, pp. 23-33. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
3. Савченко А.А., Догадин С.А., Дудина М.А., Мацинина В.П. Клинико-иммунологические показатели и их взаимосвязь с тиреоидным статусом у больных болезнью Грейвса в зависимости от уровня аутоантител к тиреопероксидазе // Проблемы эндокринологии, 2016. Т. 62, № 1. С. 4-9. [Savchenko A.A., Dogadin S.A., Dudina M.A., Matsynina V.P. The clinical and immunological indices and their interaction with thyroid status in patients with Graves' disease depending on thyrocytes peroxidase autoantibodies level. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2016, Vol. 62, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)] doi: 10.14341/probl20166214-9.
4. Dhaliwal B., Pang M.O., Keeble A.H., James L.K., Gould H.J., McDonnell J.M., Sutton B.J., Beavil A.J. IgE binds asymmetrically to its B cell receptor CD23. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, p. 45533.
5. Eshaghkhani Y., Sanati M.H., Nakhjavani M., Safari R., Khajavi A., Ataei M., Jadali Z. Disturbed Th1 and Th2 balance in patients with Graves' disease. *Minerva Endocrinol.*, 2016, Vol. 41, no. 1, pp. 28-36.
6. Hu Y., Tian W., Zhang L.L., Liu H., Yin G.P., He B.S., Mao X.M. Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 2012, 166, Vol. 4, pp. 641-646.
7. Klatka M., Grywalska E., Partyka M., Charytanowicz M., Kiszczak-Bochynska E., Rolinski J. Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity*, 2014, Vol. 47, no. 3, pp. 201-211.
8. Kurozumi A., Okada Y., Arai T., Narisawa M., Torimoto K., Yamamoto S., Tanaka Y. Induction of thyroid remission using rituximab in a patient with type 3 autoimmune polyglandular syndrome including Graves' disease and type 1 diabetes mellitus: a case report. *Endocr. J.*, 2015, Vol. 62, no. 1, pp. 69-75.
9. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
10. Pawlowski P., Grubczak K., Kostecki J., Ilendo-Poskrobko E., Moniuszko M., Pawlowska M., Rejdak R., Reszec J., Mysliwiec J. Decreased frequencies of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> in patients with Graves' disease and Graves orbitopathy: Enhancing effect of insulin growth factor-1 on Treg cells. *Horm. Metab. Res.*, 2017, Vol. 49, no. 3, pp. 185-191.
11. Peng D., Xu B., Wang Y., Guo H., Jiang Y. A high frequency of circulating Th22 and Th17 cells in patients with new onset Graves' disease. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e68446. doi: 10.1371/journal.pone.0068446.

12. Segundo C., Rodríguez C., García-Poley A., Aguilar M., Gavilán I., Bellas C., Brieve J.A. Thyroid-infiltrating B lymphocytes in Graves' disease are related to marginal zone and memory B cell compartments. *Thyroid*, 2001, Vol. 11, no. 6, pp. 525-530.
13. Smith T.J., Hegedüs L. Graves' disease. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 375, no. 16, pp. 1552-1565.
14. Song R.H., Yu Z.Y., Qin Q., Wang X., Muhali F.S., Shi L.F., Jiang W.J., Xiao L., Li D.F., Zhang J.A. Different levels of circulating Th22 cell and its related molecules in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 4024-4031.
15. Yuan Q., Zhao Y., Zhu X., Liu X. Low regulatory T cell and high IL-17 mRNA expression in a mouse Graves' disease model. *J. Endocrinol. Invest.*, 2017, Vol. 40, no. 4, pp. 397-407.

---

**Авторы:**

**Савченко А.А.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Дудина М.А.** — к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Борисов А.Г.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Догадин С.А.** — д.м.н., профессор, профессор кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Кудрявцев И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Мошев А.В.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Маньковский В.А.** — врач-хирург хирургического отделения № 2 КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Physiology Department, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Dudina M.A.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Dogadin S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Internal Medicine, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Moshev A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Mankovskiy V.A.**, Clinical Surgeon, The Surgery Department No. 2, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 26.07.2017  
Принята к печати 22.09.2017

---

Received 26.07.2017  
Accepted 22.09.2017