



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОЛЛИКУЛОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И СОСТАВ ИНТРАТИРЕОИДНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

^{1,3}Дудина М.А., ¹Медведева Н.Н., ²Савченко А.А., ²Мошев А.В., ¹Жуков Е.Л.,
¹Хапилина Е.А., ¹Ковалева Г.К., ^{1,3}Догадин С.А., ³Маньковский В.А.

¹Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,

²Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук,

³Красноярская Краевая клиническая больница, Красноярск, Россия, e-mail: margo85_@bk.ru

Для цитирования:

Дудина М.А., Медведева Н.Н., Савченко А.А., Мошев А.В., Жуков Е.Л., Хапилина Е.А., Ковалева Г.К., Догадин С.А., Маньковский В.А. Морфологические особенности фолликулов щитовидной железы и состав интратиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса. Морфологические ведомости. 2021;29(2):556. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(2\).556](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(2).556)

Резюме. Накопление Т-лимфоцитов в паренхиме щитовидной железы при гипертиреозе аутоиммунного генеза ограничено, что может свидетельствовать о первичной роли Т-лимфоцитов в развитии болезни Грейвса. Механизмы инвазивной активности лимфоцитов в паренхиме щитовидной железы и ее морфологической перестройки при болезни Грейвса неизвестны. Цель исследования - изучение морфологических особенностей тироцитов фолликулов щитовидной железы и фенотипического состава интратиреоидных лимфоцитов при болезни Грейвса. В исследовании использованы ультразвуковые, гистологические, микро-морфометрические, иммунологические и иммуноферментный методы исследования. Материалом для исследования послужили операционные биоптаты щитовидной железы, полученные у пациентов при эпифасциальной тиреоидэктомии после достижения медикаментозного эутиреоза. В исследование было включено 58 женщин с болезнью Грейвса, средний возраст 40,4±13,2 лет, из них 18 (31,11%) с впервые верифицированным диагнозом и 40 (68,96%) с рецидивом заболевания. Результаты проведенных исследований показали, что исходом тканеспецифичного аутоиммунного воспаления и длительной тиреостатической терапии у пациентов с болезнью Грейвса является перестройка тиреоидного эпителия с гистологическими признаками хронического аутоиммунного тиреоидита, особенно выраженная при рецидиве заболевания. В группе пациентов с рецидивом болезни Грейвса повышено процентное содержание Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+CD4+CD127LowCD25High и В1-клеток памяти ($p<0,001$), при снижении содержания Т-активированных и цитотоксических активированных Т-клеток, а также популяции В1-лимфоцитов ($p<0,01$), в сравнении с уровнем, установленным у пациентов с впервые выявленным заболеванием. Полученные данные позволяют предположить, что интратиреоидная Т-клеточная агрессия в фазу аутоиммунного гипертиреоза при болезни Грейвса, сменяющаяся медикаментозным эутиреозом и накоплением антигипертиреоидных препаратов в щитовидной железе проявляется в морфофункциональных реакциях паренхимы щитовидной железы и вносит существенный вклад в иммунопатогенез заболевания. Клинико-морфологические параллели фенотипов лимфоцитов крови и паренхимы щитовидной железы у пациентов с болезнью Грейвса доказывают наличие тканеспецифичного аутоиммунного воспаления и перестройки тиреоидного эпителия, с гистологическими признаками хронического аутоиммунного тиреоидита.

Ключевые слова: щитовидная железа; болезнь Грейвса; тироциты; морфометрия; фенотип интратиреоидных лимфоцитов; эпифасциальная тиреоидэктомия

Статья поступила в редакцию 21 октября 2020

Статья принята к публикации 6 июля 2021

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE THYROID FOLLICLES AND INTRATHYROID LYMPHOCYTE COMPOSITION IN GRAVES' DISEASE

^{1,3}Dudina MA, ¹Medvedeva NN, ²Savchenko AA, ²Moshev AV, ¹Zhukov EL, ¹Hapilina EA,
¹Kovalyova GK, ^{1,3}Dogadin SA, ³Man'kovsky VA

¹Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, ²Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ³Krasnoyarsk Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russia, e-mail: margo85_@bk.ru

For the citation:

Dudina MA, Medvedeva NN, Savchenko AA, Moshev AV, Zhukov EL, Hapilina EA, Kovalyova GK, Dogadin SA, Man'kovsky VA. Morphological features of the thyroid follicles and intrathyroid lymphocyte composition in Graves' disease. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2021;29(2):556. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29\(2\).556](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2021.29(2).556)

Summary. The accumulation of T-lymphocytes in the parenchyma of the thyroid gland in hyperthyroidism of autoimmune genesis is limited, which may indicate the primary role of T-lymphocytes in the development of Graves' disease. The mechanisms of invasive activity of lymphocytes in the parenchyma of the thyroid gland and its morphological rearrangement in Graves' disease are unknown. The aim of the investigation was to study the morphological characteristics of thyroid follicle thyrocytes and the phenotypic composition of intrathyroid lymphocytes in Graves' disease. In the study used ultrasound, histological, micro-morphometric, immunological and enzyme-linked immunosorbent assay. The material for the study was surgical biopsy specimens of the thyroid gland obtained in patients with epifascial thyroidectomy after attaining drug-induced euthyroidism. The study included 58 women with Graves' disease, mean age 40.5±13.2 years, including 18 (31.11%) with a newly verified diagnosis and 40 (68.96%) with a relapse of the disease. The results of the studies have shown that the outcome of tissue-specific autoimmune inflammation and long-term thyreostatic therapy in patients with Graves' disease is the rearrangement of the thyroid epithelium with histological signs of chronic autoimmune thyroiditis, especially pronounced in case of relapse of the disease. In the group of patients with relapse of Graves' disease, the percentage of T-lymphocytes with the CD3+CD4+CD127LowCD25High phenotype and B1 memory cells ($p<0.001$) is increased, with a decrease in the content of T-activated and cytotoxic activated T-cells, as well as the population of B1-lymphocytes ($p<0.01$), in comparison with the level established in patients with newly diagnosed disease. The data obtained suggest that intrathyroid T-cell aggression in the phase of autoimmune hyperthyroidism in Graves' disease, followed by drug euthyroidism and the accumulation of antithyroid drugs in the thyroid

gland is manifested in the morphological and functional reactions of the thyroid parenchyma and makes a significant contribution in the immunopathogenesis of the disease. Clinical and morphological parallels of the phenotypes of blood lymphocytes and thyroid parenchyma in patients with Graves' disease prove the presence of tissue-specific autoimmune inflammation and rearrangement of the thyroid epithelium, with histological signs of chronic autoimmune thyroiditis.

Key words: *thyroid gland; Graves' disease; thyrocytes; morphometry; the phenotype of intrathyroid lymphocytes; epifascial thyroidectomy*

Article received 21 October 2020

Article accepted 6 July 2021

Введение. Болезнь Грейвса (далее - БГ) – органоспецифическое аутоиммунное заболевание, обусловленное выработкой тиреоидстимулирующих иммуноглобулинов (далее - ТСИ), стимулирующих пролиферацию тиреоцитов за счет взаимодействия с рецепторами тиреотропного гормона (далее - рТТГ) на мембране фолликулярных клеток щитовидной железы (далее - ЩЖ) [1]. Наибольшее внимание уделяется антителам (далее - АТ), стимулирующим функцию ЩЖ (TSAб), поскольку они взаимодействуют с рТТГ на мембране тиреоцитов и повышают продукцию цАМФ, приводя к повышенной секреции тироксина и трийодтиронина. TSAб направлены против эпитопов внеклеточного домена рТТГ и являются агонистами ТТГ. Они способны усиливать функцию тиреоцитов в течение нескольких часов, тогда как сам ТТГ действует менее продолжительно [2-3]. В аутоиммунный процесс при БГ могут вовлекаться все компоненты паренхимы ЩЖ [4]. Существует предположение, что тиреоциты, экспрессируя молекулы HLA и презентирова антиген непосредственно Т-клеткам, могут инициировать аутоиммунное заболевание ЩЖ, после воздействия какого-либо внешнего стимула [5]. Было показано, что аккумуляция Т-клеток в паренхиме ЩЖ при БГ сильно рестриктирована, что может свидетельствовать о первичной роли Т-клеток в развитии гипертиреоза аутоиммунного генеза. В более поздних работах [6-7] было продемонстрировано, что снижение активности ТСИ, часто наблюдаемое после субтотальной тиреоидэктомии, обуславливается, вероятно, тем, что с тиреоидной паренхимой удаляется и основная масса лимфоцитов, продуцирующих АТ к рТТГ. Рецидив послеоперации может быть связан с сохранением достаточного объема тиреоидной паренхимы, способной реагировать на ТСИ, и достаточного количества лимфоцитов, способных поддерживать аутоиммунное воспаление. К настоящему времени до конца не ясны механизмы

развития лимфоидной инфильтрации ЩЖ при БГ, а также участия в этом процессе клеток иммунной системы и тиреоцитов. Очевидно, что аутоиммунное воспаление при БГ меняет морфологическую структуру ЩЖ и представляет собой результат интегрированных взаимодействий лимфоцитов, мигрировавших непосредственно в ткань железы, и инфильтрировавших ее с тиреоцитами, которые приобрели способность aberrantly экспрессировать широкий спектр молекул клеточной адгезии, HLA I и II класса [8-9]. В то же время остаются недостаточно изученными особенности структуры тиреоидного эпителия, субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов паренхимы ЩЖ, у пациентов БГ в исходе длительной терапии антититиреоидными препаратами (АТП).

Цель исследования: изучить морфологические особенности фолликулов ЩЖ и фенотипический состав интратиреоидных лимфоцитов у пациентов БГ после эпифасциальной тиреоидэктомии.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 58 женщин с БГ, средний возраст $40,54 \pm 13,24$ лет, из них 18 (31,11%) - с впервые верифицированным диагнозом и 40 (68,96%) - с рецидивом заболевания. Диагноз БГ (шифр МКБ – E05.0) основывался на клинико-лабораторных признаках: жалобах, клинической картине тиреотоксикоза при объективном осмотре, характерных сонографических изменениях ЩЖ, а также повышенном титре АТ к рТТГ в сыворотке крови и соответствующих изменениях тиреоидного статуса [10]. Подробная клинико-лабораторная характеристика обследуемых пациентов представлена в таблице 1. Инструментальные методы диагностики. Исследование ЩЖ проводилось при помощи аппарата «Philips iU22 xMatrix» (США) с линейным датчиком 7,5 МГц. Увеличенным считался объем ЩЖ у обследуемых женщин превышающий 18 мл, рассчитанный по фор-

муле J. Brunn (1981). Диффузным зобом (ДТЗ) обозначалось диффузное увеличение ЩЖ без узловых образований; узловым (УТЗ) - узловые образования без увеличения объема ЩЖ, многоузловым зобом (МТЗ) - несколько узловых образований в ЩЖ. При обнаружении таких образований пациенты из исследования исключались.

Микроскопия и морфометрия гистологических срезов ЩЖ. После достижения медикаментозного эутиреоза всем пациентам проводилась эпифасциальная тиреоидэктомия. Часть удаленной ЩЖ погружалась в пластиковый контейнер с изотоническим раствором натрия хлорида для последующего проведения гистологического анализа и выделения интра tireоидных лимфоцитов. Отобранный операционный материал ЩЖ фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем образцы обезжизивали в возрастающей концентрации спирта, впоследствии заливали в парафин-воск (автоматизированный гистологический процессор Leica TP 120; станция заливки Leica EG 150H с охлаждающим модулем Leica EG 1150C, Германия). Серийные парафиновые срезы толщиной 6–8 мкм изготавливали на универсальном автоматизированном микро-томе Microm HM-360 (Microm International GmbH, Германия). После окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином проводили обзорную микроскопию и морфометрию на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U с цифровой камерой для фото- и видеодокументации Nikon DS-Fi2 (Nikon, Япония) и пакетом программного обеспечения NIS-Elements Document и JMicroVision. При обзорной микроскопии проводили общую оценку структуры ЩЖ и полуколичественную морфометрию. Морфометрию гистологических срезов проводили по алгоритму описания паренхимы оперативно удаленных и диффузно измененных щитовидных желез [11]. Учитывались следующие параметры: распространенность фестончатых фолликулов, степень плотности коллоида, выраженность краевой резорбции коллоида и лимфоидной инфильтрации, наличие сосочковых структур, подушек Сандерсона и лимфоидных фолликулов (таблица 2).

Для кариометрии изготавливали микрофотографии различных полей зрения и измеряли их с помощью программы JMicroVision 1.2.7. С каждого препарата паренхимы ЩЖ от каждого пациента считали по 10 ядер тиреоцитов в пяти полях зрения. Всего было произведено 2900 измерений площади ядер тиреоцитов.

Выделение лимфоцитов из паренхимы ЩЖ и цитометрический анализ. Суспензию лимфоцитов получали путем мягкого механического выдавливания клеток из фрагментированной паренхимы ЩЖ. Клетки трижды отмывали в растворе Хенкса. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [13]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов.

Иммунологические методы исследования. Исследование фенотипа интра tireоидных Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5), PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) и APC (allophycocyanin) в следующих панелях: CD45-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7/CD8-APC и CD5-FITC/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7.

Иммунохимические методы исследования. Методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (ХИАМ) на автоматическом анализаторе Architect i1000sr (Abbott Diagnostics, США) определяли уровень ТТГ и свободного тироксина (св.Т4) в сыворотке крови, указанный референсный диапазон, соответственно, 0,35–4,94 мМЕ/л и 9,01–19,05 пмоль/л.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов (Me (Q₁-Q₃))

Показатель	Впервые выявленная БГ n=18	Рецидив БГ n=40	P
Средний возраст пациентов, лет	44,46±14,02	40,86±11,06	-
Продолжительность приема АТП (с момента выявления заболевания), мес.	2,4 (1,3 – 4,1)	11,4 (5,8 – 17,1)	0,004
Объем ЩЖ, мл	21,90 (18,8 – 48,75)	46,65 (28,15 – 84,35)	0,010
ТТГ, мМЕ/л	0,15 (0,01 – 0,49)	0,54 (0,14 – 1,4)	0,008
Свободный Т4, пмоль/л	15,63 (11,60 – 24,91)	15,26 (10,80 – 27,01)	-
Свободный Т3, пг/мл,	4,70 (3,71–6,30)	5,93 (3,61–7,62)	-
АТ к рТТГ, мЕд/л	10,81 (6,21– 31,28)	9,70 (8,51– 13,50)	-
АТ к ТПО, мЕд/л	223 (191–374)	42 (14 – 543)	0,003

Таблица 2

Критерии морфологической оценки паренхимы щитовидной железы

Параметр	Степень выраженности признака		
Распространенность фестончатых фолликулов	Низкая (менее ¼ поля зрения при объективе ×10)	Умеренная (от ¼ до ½ поля зрения при объективе ×10)	Высокая (более ½ поля зрения при объективе ×10)
Степень плотности коллоида	Жидкий (бледнее, чем междольковая соединительная ткань)	Средний (такая же, как междольковая соединительная ткань)	Плотный (интенсивнее, чем междольковая соединительная ткань)
Выраженность краевой резорбции коллоида	Низкая (наблюдается в фолликулах в менее чем ¼ поля зрения при объективе ×10)	Средняя (наблюдается в фолликулах от ¼ до ½ поля зрения при объективе ×10)	Высокая (наблюдается в фолликулах в более чем ½ поля зрения при объективе ×10)
Сосочковые структуры	Небольшое количество (наблюдается в фолликулах в менее чем ¼ поля зрения при объективе ×10)	Умеренное количество (наблюдается в фолликулах от ¼ до ½ поля зрения при объективе ×10)	Большое количество (наблюдается в фолликулах в более чем ½ поля зрения при объективе ×10)
Подушки Сандерсона	Небольшое количество (наблюдается в фолликулах в менее чем ¼ поля зрения при объективе ×10)	Умеренное количество (наблюдается в фолликулах от ¼ до ½ поля зрения при объективе ×10)	Большое количество (наблюдается в фолликулах в более чем ½ поля зрения при объективе ×10)
Выраженность лимфоидной инфильтрации	Небольшая (инфильтрация реже, чем в 3-х полях зрения при объективе ×10)	Умеренная (инфильтрация в 1-3-х полях зрения при объективе ×10)	Выраженная (инфильтрация в каждом поле зрения при объективе ×10)
Распространенность лимфоидных фолликулов	Низкая (менее ¼ поля зрения при объективе ×10)	Умеренная (от ¼ до ½ поля зрения при объективе ×10)	Высокая (более ½ поля зрения при объективе ×10)

Количественное определение свободного трийодтиронина (свободный ТЗ) в сыворотке крови осуществляли методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ДС-ИФА-ТИРОИД-ТЗсвободный» (ООО «НПО «Диагностические системы»), референсный интервал (1,2-4,2 пг/мл). Уровень АТ к рТТГ и антител к тиреоидной пероксидазе (АТ к ТПО) оценивался методом ИФА при помощи соответствующих наборов «Medizym T.R.A.» («Medipan Diagnostica», Германия) и «АТ-ТПОХема-Медика», (Россия), референсный интервал < 35 мЕд/л. Рекомендованная точка разделения (cut-off) для уровня АТ к рТТГ составила 1,5 мЕд/л («серая» зона 1-1,5 мЕд/л).

Статистические методы исследования. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q1-Q3)), а также в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений от среднего $M \pm SD$ в случае нормального распределения показателей. Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Шапиро-Уилка. Достоверность различий между исследуемыми показателями оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (Spearman rank R). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Согласие пациентов. 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.

Результаты исследования и обсуждение. При морфологической характеристике послеоперационных препаратов ЩЖ у всех пациентов с впервые выяв-

ленной БГ наблюдалась выраженная краевая резорбция коллоида, преобладание сосочковых структур, а среднее значение площади ядер составило 31,79 кв. мкм. При этом, у 12 (66,62%) пациентов отмечалась выраженная пролиферация тиреоцитов. В 15 (83,33%) случаях впервые выявленной БГ в препаратах ЩЖ встречался коллоид высокой и средней плотности, лимфоидная инфильтрация, подушки Сандерсона и регионарные кровоизлияния. У половины пациентов этой группы отмечалось преобладание склеротических изменений, лимфоидных фолликулов и расстройства кровообращения. В единичных случаях были зафиксированы выраженная аргирофильная сеть и отсутствие коллоида. В группе пациентов с рецидивирующим течением БГ во всех препаратах ЩЖ отмечалось преобладание сосочковых структур, у 37 (93,91%) из них преобладал коллоид высокой и средней плотности, у 33 (81,82%) - подушки Сандерсона, а средняя площадь ядер была равна 30,30 кв.мкм. Лимфоидная инфильтрация в этой группе пациентов отмечалась в 31 (78,73%) случаях, при этом краевая резорбция коллоида и пролиферация тиреоцитов встречались одинаково часто у 29 (72,71%) пациентов. У половины пациентов с рецидивом БГ наблюдались склеротические изменения стромы ЩЖ, у 30 (75,74%) кровоизлияния и 14 (36,33%) расстройства кровообращения. Такие морфологические структуры ЩЖ, как лимфоидные фолликулы и аргирофильная сеть с отсутствием коллоида встречались, соответственно, в 18 (45,43%) и 2 (6,06%) случаях рецидивирующего течения БГ.

При проведении сравнительной полуколичественной морфометрии установлено, что характерными особенностями морфологической структуры ЩЖ пациентов с впервые выявленной БГ были высокая распространенность фестончатых фолликулов и высокая степень краевой резорбции фолликулов (рис. 1).

Большее количество коллоида высокой и средней плотности было зафиксировано у пациентов с впервые выявленной БГ, а в группе пациентов с рецидивом заболевания, напротив, коллоид был более жидкий или отсутствовал. При изучении

серийных гистологических срезов послеоперационного материала ЩЖ было установлено, что структура эпителия фолликулов ЩЖ пациентов с рецидивом БГ отличается выраженной лимфоидной инфильтрацией, преобладанием сосочко-

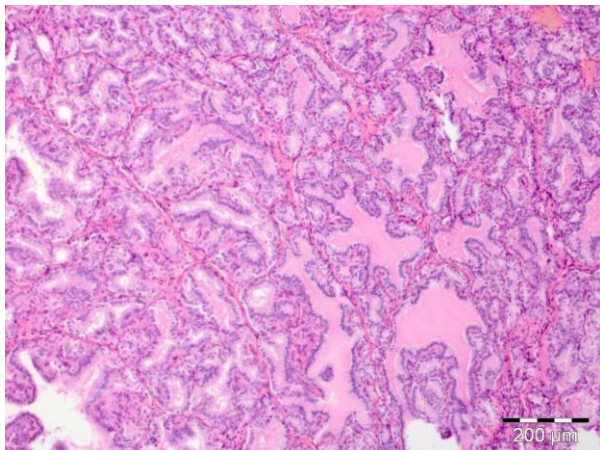


Рис. 1. Микрофото щитовидной железы пациента с впервые выявленной БГ с наличием фестончатых фолликулов и участков краевой резорбции коллоида. Окраска: гематоксилин-эозином. Ув.: x200.

При микроскопическом изучении послеоперационных гистологических препаратов ЩЖ медиана площади ядер тиреоцитов у пациентов БГ составила 31,96 кв. мкм (26,29-37,73). При этом обнаружено линейное изменение уровня ТТГ в зависимости от площади ядер тиреоцитов: у пациентов БГ с площадью ядер тиреоцитов менее 31,96 кв. мкм уровень ТТГ был достоверно ниже ($Me=0,58$; $0,42-2,59$, $p<0,01$), чем у пациентов с площадью ядер тиреоцитов $\geq 31,96$ кв. мкм. ($0,2$ ($0,03-0,38$)). В зависимости от площади ядер тиреоцитов менялся и уровень активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) в периферической крови: достоверное увеличение $CD3^+CD25^+$ -лимфоцитов ($Me=4,22$; $0,4-9,72$, $p<0,05$) наблюдалось у пациентов БГ с площадью ядер тиреоцитов $<31,96$ кв. мкм.

Таким образом, для пациентов с впервые верифицированным диагнозом БГ характерно умеренное содержание фолликулов фестончатой формы, меньшее содержание сосочковых структур и подушек Сандерсона, незначительно выраженная лимфоидная инфильтрация и

вых структур, подушек Сандерсона, а также достоверно высокой распространенностью лимфоидных фолликулов, в сравнении с морфологической структурой ЩЖ пациентов с впервые выявленным заболеванием (рис. 2).

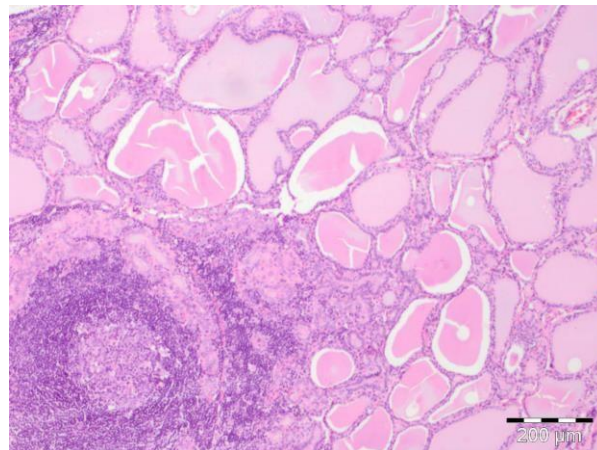


Рис. 2. Микрофото щитовидной железы пациента с рецидивом БГ с наличием лимфоидного фолликула. Окраска: гематоксилин-эозином. Ув.: x200.

небольшое количество лимфоидных фолликулов. У пациентов с рецидивом заболевания, в отличие от пациентов с впервые выявленной БГ, отмечена достоверно большая распространенность сосочковых структур, лимфоидных фолликулов и подушек Сандерсона, а также выраженность лимфоидной инфильтрации.

Известно, что образование лимфоидных фолликулов связано с длительной антигенной стимуляцией и продукцией антититреоидных антител плазматическими клетками [14]. Сравнительное исследование содержания интратиреоидных Т- и В-лимфоцитов в паренхиме ЩЖ, в зависимости от варианта течения заболевания, позволило установить выраженные отличия в группе пациентов с рецидивом БГ (табл. 3).

Обнаружено, что процентное количество цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с рецидивом БГ значительно повышено: при рецидиве $Me=31,1\%$ (22,3-41,6), у лиц с впервые выявленным заболеванием – $Me=12,6\%$ (9,1-26,1), $p<0,01$. Также, в группе пациентов с рецидивом БГ в

паренхиме ЩЖ повышено процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов (Me=22,4%; 15,9-36,1, $p<0,001$) и В1-клеток памяти (Me=6,0%; 3,8-7,6, $p<0,01$), при снижении содержания Т-активированных лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD25⁺, цитотоксических активированных Т-клеток и популяции В1- лимфоцитов, в сравнении с уровнем, установленным у пациентов с впервые выявленным заболеванием. С помощью корреляционного анализа исследованы особенности взаимосвязи между количеством Т- и В-лимфоцитов, и показателями, характеризующими функцию и морфологическую структуру ЩЖ. Установлено, что только при рецидиве заболевания выявляются отрицательные взаимосвязи между количеством интратиреоидных CD19⁺CD27⁺-лимфоцитов и концентрацией ТТГ ($r=-0,97$, $p<0,001$), и уровнем интратиреоидных CD3⁺CD4⁺-клеток и средней площадью ядер тиреоцитов ($r=-0,79$, $p<0,001$), а также одна положительная связь между содержанием интратиреоидных CD3⁺-клеток и концентрацией АТ к

ТПО ($r=0,64$, $p<0,001$). У обследованных пациентов с впервые выявленной БГ взаимосвязей количества интратиреоидных Т- и В-лимфоцитов с другими исследуемыми показателями не обнаружено.

При исследовании особенностей фенотипического состава Т- и В- лимфоцитов в паренхиме ЩЖ пациентов с БГ было установлено, что интратиреоидный субпопуляционный состав клеток иммунной системы изменяется в зависимости от степени распространенности лимфоидных фолликулов. Так, в группе пациентов БГ с высокой распространенностью лимфоидных фолликулов в паренхиме ЩЖ наблюдалось уменьшение относительного числа В-клеток памяти (1,81; 0,92–2,10, $p<0,05$), В2-лимфоцитов (8,69; 6,88–16,95, $p<0,05$), активированных Т- лимфоцитов (0,41; 0,15–1,1, $p<0,01$), а также активированных цитотоксических Т- клеток (CD3⁺CD8⁺CD25⁺) (0,57; 0,09–1,08, $p<0,05$) и Т-лимфоцитов-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) (0,62; 0,39–0,92, $p<0,01$).

Таблица 3

Содержание Т- и В-лимфоцитов (в %) в щитовидной железе у пациентов с впервые выявленной БГ и при рецидиве заболевания (Me, Q₁-Q₃)

Показатели	Впервые выявленная БГ; n=18	Рецидив БГ; n=40	P
CD3 ⁺	55,3 (43,3– 64,8)	76,3 (57,4–84,6)	<0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺	44,4 (41,7–58,4)	43,9 (35,1–48,9)	-
CD3 ⁺ CD8 ⁺	12,6 (9,1–26,1)	31,1 (22,3–41,6)	<0,001
CD3 ⁺ CD25 ⁺	4,0 (2,3–7,1)	1,5 (0,3–3,9)	<0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	1,5 (0,9–3,0)	0,5 (0,3 – 1,0)	<0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	1,3 (0,2–3,2)	1,1 (0,4–2,1)	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}	2,7 (0,6–3,9)	22,4 (15,9–36,1)	<0,001
CD19 ⁺	14,8 (13,5–15,4)	13,3 (10,4–19,0)	-
CD19 ⁺ CD27 ⁻	11,0 (8,7–17,0)	7,3 (5,1–12,1)	-
CD19 ⁺ CD27 ⁺	3,3 (2,3–3,4)	6,0 (3,8–7,6)	<0,001
CD19 ⁺ CD5 ⁻	13,2 (10,6–16,7)	12,8 (10,4–16,5)	-
CD19 ⁺ CD5 ⁺	1,3 (1,0–2,6)	0,4 (0,2–1,1)	<0,001

Многовариантность морфологических изменений ЩЖ при аутоиммунных тиреопатиях обуславливает сложность клинической интерпретации особенностей органоспецифического аутоиммунного процесса при БГ [11]. Проведенные

ранее фундаментальные [4, 7, 9] исследования демонстрируют, что функционально-морфологическая оценка состояния тиреоцитов и выявленные гистологические изменения операционного материала ЩЖ при гипертиреозе аутоиммунного

генеза должны быть интерпретированы не только с учетом неоднородности эпителиального компонента в разных участках железы и её стромы, но и проведенного консервативного лечения АТП.

Аутоиммунный характер БГ, наличие лимфоидной инфильтрации и сочетание ее с наличием клеток Аскинази позволило говорить о родстве этого заболевания с хроническим аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) [11, 15]. Результаты нашего исследования согласуются с предположением ряда авторов о том, что при клиническом диагнозе БГ не исключается морфологическое сочетание двух аутоиммунных тиреопатий – АИТ и БГ одновременно [16-17]. Во многих работах было показано, что CD4⁺-клетки пациентов АИТ и БГ сенсibilизированы к интактным тиреоцитам или отдельным тиреоидным антигенам (ТПО или рТТГ) [5, 18].

Выявленные изменения гистологической структуры ЩЖ и субпопуляционного состава интратиреоидных лимфоцитов в группе пациентов с рецидивом заболевания указывают на наличие органоспецифических нарушений иммунорегуляции при БГ, поддерживающих и усиливающих аутоиммунный процесс, независимо от длительности лечения АТП и степени компенсации гипертиреоза. В этом аспекте следует остановиться на оценке пролиферации и десквамации тиреоидного эпителия. Оба эти явления в настоящее время рассматриваются как проявление своеобразной морфодинамики или морфокинетики, являющейся отражением изменений функции железы [11, 14]. Высказано мнение, что основой десквамации, как клеточного деструктивного процесса, может быть механизм апоптоза [6, 15]. Причем, экспериментально подтверждено, что мигрировавшие в паренхиму ЩЖ Т-лимфоциты способны вызывать гибель клеток-мишеней не только путем некроза, но и путем индукции апоптоза [4]. Высокая распространенность лимфоидной инфильтрации существенно дополняет ранее полученные нами данные [19] о снижении содержания Т-регуляторных клеток (CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}) в периферической крови при БГ. Выявленное увеличение регуляторных Т-клеток в па-

ренхиме ЩЖ в настоящем исследовании в группе пациентов с рецидивом заболевания с одной стороны объясняется эффекторными механизмами воздействия иммуноцитов на клетки-мишени при развитии гипертиреоза, но с другой стороны отражает тяжелый дефект специфических регуляторных Т-лимфоцитов, независимый от степени компенсации гипертиреоза и длительности антигипертиреоидной лекарственной терапии. Можно предположить, что тиреоидная клетка при БГ является объектом иммунологической атаки вследствие одномоментно протекающих двух процессов: снижения количества и генерализованной супрессорной функции Т-лимфоцитов, и прямой антигенспецифической цитотоксичности интратиреоидных лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High} на тиреоциты. Таким образом, миграция Т-лимфоцитов в ЩЖ может быть одним из морфологических признаков десквамации, как компенсаторного клеточно-деструктивного процесса перестройки тиреоидной паренхимы.

Известно, что предоперационное применение АТП снижает уровень тиреоидных гормонов, что уже вторично уменьшает презентацию антигенов тиреоцитов интратиреоидным Т-лимфоцитам и тем самым продукцию АТ к рТТГ [14]. В то же время, увеличение количества реактивных клеток иммунной системы в паренхиме ЩЖ, в группе пациентов с низкой распространенностью лимфоидных фолликулов, может быть свидетельством регенерации сохранившегося фолликулярного эпителия и морфологическим проявлением уменьшения гормонопозза. С другой стороны, нормализация функции ЩЖ должна была бы ослаблять сигнализацию тиреоцитов иммуноцитам и тем самым восстанавливать прежнее состояние иммунорегуляции, приводя к ремиссии. Но, выявленные закономерности морфокинетики ЩЖ в сочетании с интратиреоидными иммунорегуляторными процессами, на фоне терапии АТП, свидетельствуют о деструкции патологически функционирующей тиреоидной паренхимы.

Интересно отметить, что АТП прерывают синтез тиреоидных гормонов и оказывают иммуносупрессивный эффект, избирательно накапливаясь в ЩЖ [1, 20]. Имеются сообщения о том, что АТП ингибируют образование свободных радикалов в клетках иммунной системы и, таким образом, снижают активность аутоиммунного процесса [21]. Тиамазол угнетает высвобождение простагландина E2, интерлейкина- α и интерлейкина-6 из тиреоцитов [6]. Считают, что снижение содержания медиаторов воспаления уменьшает лимфатическую инфильтрацию ЩЖ и последующее образование антитиреоидных антител, в том числе и TSAb [22]. Было показано, что выраженная лимфоцитарная инфильтрация и аутоиммунная деструкция тиреоидной паренхимы может приводить к развитию спонтанной ремиссии заболевания или индуцированному тиреостатической терапией гипотиреозу, что, также, может объяснять выявленные особенности кариометрии тиреоцитов и морфологические признаки АИТ при исследовании постоперационного материала ЩЖ у пациентов БГ в настоящем исследовании. Наконец, к перестройке тиреоидного эпителия, с признаками АИТ может приводить длительная терапия АТП и появление интратиреоидных АТ,

блокирующих рТТГ (ТВАб). ТВАб, предотвращая активацию рТТГ, препятствуют стимулирующему эффекту не только самого ТТГ, но и ТСИ [6, 24], что может иметь значение в патогенезе атрофии ЩЖ и развитии гипотиреоза с морфологическими признаками АИТ у некоторых пациентов с БГ. Можно предположить, что такая прогрессивная смена титра стимулирующих и блокирующих АТ к рТТГ при БГ, обуславливает не только компенсаторную перестройку тиреоидного эпителия и смену функционального состояния ЩЖ, но и объясняет преобладание рецидивирующего варианта течения заболевания в клинической практике.

Заключение. Клинико-морфологические параллели лимфоцитов крови и паренхимы ЩЖ у пациентов БГ позволяют предположить о наличии тканеспецифичного аутоиммунного воспаления и перестройки тиреоидного эпителия, с гистологическими признаками хронического АИТ. В связи с этим, необходимы дальнейшие клинико-морфологические исследования с учетом не только иммуносупрессивного действия АТП, но и функциональной гетерогенности тиреоцитов и, как следствие, вероятностью сочетания различной тиреоидной патологии.

Литература References

1. Gallo D, Piantanida E, Gallazzi M, Bartalena L, Tanda ML, Bruno A, Mortara L. Immunological Drivers in Graves' Disease: NK Cells as a Master Switcher. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;(32765422) Epub. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00406>.
2. Zdor VV, Tihonov YN. Immunnyeigistologicheskie izmeneniya v zhelezah vnutrennej sekrecii pri eksperimental'nom tireotoksikoze i gipotireoze. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2015;10(1):55-60.
3. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. TSH receptor antibodies: relevance & utility. *Endocr Pract*. 2020;26(1):97-106. <https://doi.org/10.4158/EP-2019-0363>.
4. Schlüter A, Eckstein AK, Brenzel A, Horstmann M, Lang S, Berchner-Pfannschmidt U, Banga JP, Diaz-Cano S. Noninflammatory Diffuse Follicular Hypertrophy/Hyperplasia of Graves Disease: Morphometric Evaluation in an Experimental Mouse Model. *Eur Thyroid J*. 2018;7(3):111-119. <https://doi.org/10.1159/000488079>.
5. Volpé R. The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocytesignalling: a review. *Curr Pharm Des*. 2001;7(6):451-60. <https://doi.org/10.2174/1381612013397898>.
6. Wiersinga WM. Graves' Disease: Can It Be Cured? *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2019;34(1):29-38. <https://doi.org/10.3803/EnM.2019.34.1.29>.

7. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2016;388(10047):906-918. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00278-6).
8. Rapoport B, McLachlan SM. Graves' hyperthyroidism is antibody-mediated but is predominantly a Th1-type cytokine disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;(25210884). Epub. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3011>.
9. Ricci D, Brancatella A, Marinò M, Rotondi M, Chiovato L, Vitti P, Latrofa F. The Detection of Serum IgMs to Thyroglobulin in Subacute Thyroiditis Suggests a Protective Role of IgMs in Thyroid Autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;(31996918). Epub. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa038>.
10. Troshina EA, Sviridenko NY, Vanushko VE, Rumyantsev PO, Fadeev VV, Petunina NA. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu toksicheskogo zoba. 2014;10(3):8-19. <https://doi.org/10.14341/probl201460667-77>.
11. Hmel'nickij OK. Gistologicheskaya diagnostika neopuholevyh zabolevanij shchitovidnoj zhelezy: Posobie dlya vrachej. SPb.: SPbMAPO, 1999. 56s.
12. Kudryavcev IV, Subbotovskaya AI. Opyt izmereniya parametrov immunnogo statusa s ispol'zovaniem shesticvetnogo citofluorimericheskogo analiza. *Medicinskaya immunologiya*. 2015;17(1):19-26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>.
13. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191-200. <https://doi.org/10.1038/nri3158>.
14. Yin Q, Jin Z, Zhou Y, Song D, Fu C, Huang F, Wang S. lncRNA: mRNA expression profile in CD4+ T cells from patients with Graves' disease. *Endocr Connect*. 2020;9(12):1202-1211. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0373>.
15. Skov J, Calissendorff J, Eriksson D, Magnusson P, Kämpe O, Bensing S, Kuja-Halkola R. Limited Genetic Overlap Between Overt Hashimoto's Thyroiditis and Graves' Disease in Twins: A Population-based Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(4):1101-1110. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa956>.
16. Saprina TV, Prohorenko TS, Martynova SY, Dzyuman AN, Zima AP, Popova OS, Hluzov IA, Latipova VI, Ryazanceva IV. Disbalans sistemy «ligand receptor» faktora nekroza opuholej-a i ekspressiya TNF-RI v tkani shchitovidnoj zhelezy u pacientov s boleznyu Grejosa. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2013;9(3):56-65.
17. Gonzalez-Aguilera B, Betea D, Lutteri L, Cavalier E, Geenen V, Beckers A, Valdes-Socin H. Conversion to Graves disease from Hashimoto thyroiditis: a study of 24 patients. *Arch Endocrinol Metab*. 2018;62(6):609-614. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000086>.
18. Xiaoheng C, Yizhou M, Bei H, Huilong L, Xin W, Rui H, Lu L, Zhiguo D. General and Specific Genetic Polymorphism of Cytokines-Related Gene in AITD. *Mediators Inflamm*. 2017;(28133421). Epub. <https://doi.org/10.1155/2017/3916395>.
19. Savchenko AA, Dudina MA, Borisov AG, Dogadin SA, Kudryavcev IV, Moshev AV, Man'kovskij VA. Vliyanie helpnyh i regulatorynyh T-kletok na fenotipicheskij sostav B-limfocitov krovi i tkani shchitovidnoj zhelezy pri bolezni Grejosa. *Medicinskaya immunologiya*. 2018;20(3):431-438. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-3-431-438>.
20. Žarković M, Wiersinga W, Perros P, Bartalena L, Donati S, Okosieme O, Morris D, Fichter N, Lareida J, Daumerie C, Burlacu MC, Kahaly GJ, Pitz S, Beleslin B, Ćirić J, Ayvaz G, Konuk O, Törüner FB, Salvi M, Covelli D, Curro N, Hegedüs L, Brix T; EUGOGO (European Group on Graves' Orbitopathy). Antithyroid drugs in Graves' hyperthyroidism: differences between «block and replace» and «titration» regimes in frequency of euthyroidism and Graves' orbitopathy during treatment. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(2):371-378. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01320-7>.
21. Abdi H, Amouzegar A, Azizi F. Antithyroid Drugs. *Iran J Pharm Res*. 2019;18(1):1-12. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112892.14005>.
22. Langenstein C, Schork D, Badenhoop K, Herrmann E. Relapse prediction in Graves' disease: Towards mathematical modeling of clinical, immune and genetic markers. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(4):571-581. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9386-8>.
23. Fathima N, Narne P, Ishaq M. Association and gene-gene interaction analyses for polymorphic variants in CTLA-4 and FOXP3 genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Endocrine*. 2019;64(3):591-604. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-01859-3>.

24. Cui Z, Wang Z, Liu X, Cai Y, Xu X, Yang T. Establishment of clinical diagnosis model of Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Transl Med.* 2019;(30616573). Epub. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1765-3>.

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дудина Маргарита Андреевна, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра госпитальной терапии и иммунологии, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, врач-эндокринолог, Краевая клиническая больница, Красноярск, Россия;
e-mail: margo85_@bk.ru

Медведева Надежда Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;
e-mail: medvenad@mail.ru

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Мошев Антон Викторович, научный сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия;
e-mail: kinger1@mail2000.ru

Жуков Евгений Леонидович, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра патологической анатомии имени профессора П.Г. Подзолкова, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Margarita A. Dudina, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of State Nutritional Therapy and Immunology, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, endocrinologist, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: margo85_@bk.ru

Nadezhda N. Medvedeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Human Anatomy, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: medvenad@mail.ru

Andrey A. Savchenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Anton V. Moshev, Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: kinger1@mail2000.ru

Evgeniy L. Zhukov, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy named after Professor P.G. Podzolkov, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: evgen_patolog@mail.ru

e-mail: evgen_patolog@mail.ru

Хапилина Елена Алексеевна, кандидат медицинских наук, доцент, кафедра анатомии человека, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;

e-mail: hapilina_elena@mail.ru

Ковалева Гульмира Кажгалиевна, кандидат биологических наук, доцент, кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;

e-mail: gulmirakovaleva@mail.ru

Догadin Сергей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, кафедра госпитальной терапии и иммунологии, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, главный внештатный эндокринолог Министерства здравоохранения Красноярского края, заведующий эндокринологическим центром, Краевая клиническая больница, Красноярск, Россия;

e-mail: sadogadin@gmail.com

Маньковский Владимир Анатольевич, хирург-эндокринолог, Краевая клиническая больница, Красноярск, Россия;

e-mail: manvlad@inbox.ru

Elena A. Hapilina, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Human Anatomy, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;

e-mail: hapilina_elena@mail.ru

Gulmira K. Kovalyova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;

e-mail: gulmirakovaleva@mail.ru

Sergey A. Dogadin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Hospital Therapy and Immunology, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Chief Freelance Endocrinologist of the Ministry of Health of the Krasnoyarsk Territory, Head of the Endocrinology Center, Krasnoyarsk Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russia;

e-mail: sadogadin@gmail.com

Vladimir A. Man'kovsky, surgeon- endocrinologist, Krasnoyarsk Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russia;

e-mail: manvlad@inbox.ru