

## Влияние локального дистанционного индуцирующего криовоздействия и фактора времени на гуморальный иммунитет больных гипотиреозом, оперированных по поводу аутоиммунного тиреоидита

М.Р. МИКИТЮК, Ю.И. КАРАЧЕНЦЕВ

*Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины, г. Харьков*

## Influence of Local Distant Inducing Cryoeffect and Time Factor on Humoral Immunity of Patients with Hypothyrosis, Operated for Autoimmune Thyroiditis

M.R. MIKITYUK, YU.I. KARACHENTSEV

*Danilevsky Institute for Problems of Endocrine Pathology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov*

Изучено в динамике влияние локального дистанционного индуцирующего криовоздействия (ЛДИК) и фактора времени на показатели гуморального звена иммунитета у 25 больных гипотиреозом, оперированных по поводу аутоиммунного тиреоидита (АИТ). Показано, что ЛДИК вызывает позитивные изменения в системе гуморального антитиреоидного иммунитета на срок более 6 мес. Постепенное угасание иммуномодулирующего эффекта через 9 мес обуславливает необходимость применения ЛДИК повторно.

**Ключевые слова:** локальное индуцирующее криовоздействие, послеоперационный гипотиреоз, аутоиммунный тиреоидит, гуморальный иммунитет.

Вивчено в динаміці дію локального дистанційного індукуючого криовпливу (ЛДІК) і фактору часу на показники гуморального імунітету у 25 хворих гіпотиреозом, оперованих з приводу аутоімунного тиреоїдиту. Показано, що ЛДІК спричинює позитивні зміни в системі гуморального антитиреоїдного імунітету на строк більше 6 міс. Повільне згасання імуномодельюючого ефекту через 9 міс обумовлює необхідність повторного застосування ЛДІК.

**Ключові слова:** локальний індукційний криовплив, післяопераційний гіпотиреоз, аутоімунний тиреоїдит, гуморальний імунітет.

The influence of local distant inducing cryoeffect (LDIC) and time factor on the immunity humoral link indices in 25 patients with hypothyrosis, operated for autoimmune thyroiditis (AIT), was studied in dynamics. LDIC was shown to cause the positive changes in the system of humoral anti-thyroid immunity for the term more than 6 months. A gradual fading of immune-modulating effect 9 months later stipulates the necessity for a repeated LDIC application.

**Key-words:** local inducing cryoeffect, post-operative hypothyrosis, autoimmune thyroiditis, humoral immunity.

Хирургическое лечение АИТ, несмотря на ряд преимуществ, не влияет на патогенетические механизмы развития аутоагрессии, а наоборот, усиливает её [1]. Снижение количества и активности Т-супрессоров при увеличении количества и повышении активности Т-хелперов приводит к избыточному образованию В-лимфоцитов, что способствует антителообразованию [5]. Образование антител к тиреоглобулину (АТ-ТГ) и микросомальному антигену (АТ-МСА) вызывает появление иммунных комплексов, выделение биологически активных веществ, что приводит к деструктивным изменениям в тиреоцитах, к прогрессирующему снижению гормональной функции щитовидной железы (ЩЖ) и развитию гипотиреоза [6]. Известные способы лечения

Surgical treatment of AIT in spite of some advantages does not affect the pathogenetic mechanisms of autoaggression development, but, in contrast, strengthens it [1]. A decrease in the amount and activity of T-suppressors when augmenting those of T-helpers results in a surplus B-lymphocyte formation, contributing to the antibody-formation [5]. The formation of antibodies to thyroglobulin (AB-TG) and microsomal antigen (AB-MSA) causes the appearance of immune complexes, the isolation of biologically active substances, that results in a destructive changes in thyrocytes, in a progressing decrease in hormonal function of thyroid gland (TG) and hypothyrosis development [6].

The routine treatments for post-operative hypothyrosis (PH) are contradictory and sometimes

**Адрес для корреспонденции:** Микитюк М.Р., Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины, ул. Артема, 8, г. Харьков, Украина 61002; тел.: +38 (057) 744-11-94, факс: +38 (0572) 58-74-92

**Address for correspondence:** Mikityuk M.R., Danilevsky Institute for Problems of Endocrine Pathology of Academy of Medical Sciences of Ukraine; 8, Artema str., Kharkov, Ukraine 61002; tel: +380 57 744 1194, fax: +38 57 2587492.

послеоперационного гипотиреоза (ПГ) противоречивы и порой совершенно исключают друг друга. В настоящее время отсутствуют какие-либо эффективные методы воздействия на собственно аутоиммунный процесс в ЩЖ (препараты гормонов ЩЖ, иммунодепрессанты, иммуномодуляторы, глюкокортикоиды, плазмаферез и др.) [3]. Этим объясняется необходимость поиска новых методов лечения, которые воздействовали бы на патогенетические звенья прогрессирования аутоагрессии у больных ПГ. Перспективным методом лечения ПГ является ЛДИК.

Современные знания о коже привели к созданию концепции нейроиммунокожной системы, которая предполагает, что морфологические особенности строения кожи позволяют ей выполнять различные иммунологические функции, большую роль в осуществлении которых играют рециркуляция лимфоцитов и дендритные клетки [3]. В последнее время внимание исследователей обращено на клетки Лангерганса (КЛ) кожи, которые являются морфологически дендритными (ретикулярными) клетками. Они способны стимулировать созревание Т-лимфоцитов аналогично кортикальному эпителию вилочковой железы. Кроме того, КЛ активируют Т-лимфоциты, секретируя цитокины [11], и представляют им тканевые антигены, индуцируя таким образом толерантность к собственным белкам, не имеющим доступа в тимус [8]. Отличительная особенность КЛ – тормозящее влияние на Т-хелперы и, следовательно, угнетение пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов, что приводит к снижению антителообразования [9]. Использование индуцирующего криовоздействия у больных с гипертрофической формой АИТ способствует снижению показателей индексов АТ-ТГ и АТ-МСА до нормальных значений. При этом выраженность иммуномодулирующего эффекта находится в зависимости от срока наблюдения (фактора времени) [7].

Цель работы – изучение влияния ЛДИК, фактора времени, их взаимодействия и сочетания на показатели гуморального иммунитета у больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ.

### **Материалы и методы**

Иммунологические исследования проведены на 109 больных гипотиреозом (103 женщины и 6 мужчин), оперированных по поводу АИТ с 1995 по 2001 годы. Возраст больных от 29 до 79 лет, средний возраст составил  $52,7 \pm 9,6$  лет. Диагноз АИТ был верифицирован клинически, лабораторно, с помощью УЗИ, по результатам гистологических исследований тиреоидной ткани после хирургического вмешательства. Из 109 больных отобрали

completely excluding each other. Now there are no efficient methods for affecting the proper autoimmune process in TG (TG hormone preparations, immunological depressants, immunological modulators, glucocorticoids, plasmapheresis etc.) [3]. This explains the necessity to search for new treatments, which could affect the pathogenetic links of autoaggression progress in PH patients. LDIC is a perspective method for PH treatment.

The current knowledge about skin resulted in creating the concept of neuro-immune-skin system, suggesting that the morphological peculiarities of skin structure made it possible to realise different immunological functions, where lymphocyte recirculation and dendrite cells played an important role [3]. Recently the attention of researchers has been paid to Langerhans's cells (LCs) of skin, being morphologically dendritic (reticular) cells. They are capable of stimulating the T-lymphocyte maturation similarly to cortical epithelium in thymus gland. In addition, LCs activate T-lymphocytes by secreting cytokines [11] and present them tissue antigens by inducing in such a way the tolerance to own proteins, having no access to thymus [8]. A distinctive feature of LCs is an inhibiting effect on T-helpers and, consequently, the suppression of proliferation and differentiation of B-lymphocytes, that results in a decrease in the antibody-formation [9].

The usage of inducing cryoeffect in patients with the AIT hypertrophic form results in a decrease in AB-TG and AB-MSA indices down to the normal values. At the same time the manifestation rate of immune modulating effect depends on the observation term (time factor) [7].

The aim of the work was to study the effect of LDIC, time factor, their interaction and combination on humoral immunity indices in patients with hypothyrosis, operated for AIT.

### **Materials and methods**

Immunological investigations were carried-out in 109 patients with hypothyrosis (103 women and 6 men), operated for AIT from 1995 to 2001. Patients aged from 29 to 79, an average age made  $52.7 \pm 9.6$  years. The AIT diagnosis was verified in clinic, laboratory, using US diagnosis, upon the results of histological studies of thyroid tissue after surgical intervention.

Among 109 patients there were selected 50, randomized using a simple non-perforating method in two groups: the control and main ones with 25 patients in each. The value of immune regulation index ( $CD4^+/CD8^+$ -cell ratio), which should be higher or equal to 2.5 (the norm is 1.7-2.5) [12], and the presence of slightly positive values for AB-TG and AB-MSA titers were the criteria for including the patients into the investigation.

50, которые были случайно распределены простым слепым методом на две группы: контрольную и основную по 25 больных в каждой. Критериями включения больных в исследование были значение индекса иммунорегуляции (соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-клеток), который должен был быть большим или равным 2,5 (норма 1,7- 2,5) [12], и наличие слабopоложительных значений титров АТ-ТГ и АТ-МСА. Больные контрольной группы получали заместительную гормональную монотерапию L-тироксина (75-100 мкг/сут), при лечении больных основной группы применяли комплексный метод – L-тироксин 75-100 мкг/сут и ЛДИК на кожу задне-медиальной поверхности средней трети правой голени однократно с длительностью экспозиции одна минута. Место криоаппликации предварительно обрабатывали раствором антисептика и выбирали так, чтобы рядом отсутствовали крупные сосуды, нервы, энергетические меридианы и биологически активные точки, а также по косметическим соображениям. Криовоздействие выполняли автономным криоинструментом со стерильным наконечником диаметром 0,5 см. Температурный режим определялся температурой испарения жидкого азота (–180÷–190°C), которым заполнялся криоинструмент. Контрольная и основная группы больных были репрезентативными и однородными по возрасту, степени тяжести гипотиреоза, состоянию медикаментозной компенсации. Динамическое наблюдение осуществляли через 3; 6 и 9 мес. Оценка иммунной системы проводилась по 4 параметрам (В-лимфоциты, АТ-ТГ, АТ-МСА, ЦИК), отражающим состояние гуморального звена иммунитета. При интерпретации полученных результатов использовали данные аналогичного обследования репрезентативной по возрасту и полу группы здоровых лиц (n=20).

Выделение мононуклеарных клеток проводилось в градиенте фиколл-верографина. При определении популяции В-лимфоцитов с помощью светового микроскопа использовали моноклональные антитела к фенотипическому маркеру CD20 (норма 6-18%), меченые пероксидазой хрена производства “Сорбент Лтд.” (Россия) [12]. Антитела к АТ-ТГ и АТ-МСА выявляли на иммуно-ферментном анализаторе АИФ-Ц-01С (Беларусь) для количественного определения антител в сыворотке крови методом непрямого иммуно-ферментного анализа (норма 0-1,4), концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови – методом селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75%-м полиэтиленгликоле с последующим фотометрическим определением плотности преципитата (норма 0-56 ед.).

The control group's patients were treated with a substitutive hormonal monotherapy with L-thyroxin (75-100 µg/day), to the patients of the main group there was applied a combined treatment, L-thyroxin (75-100 µg/day) and LDIC on skin of posterior-medial surface of the right crus middle third with 1 min exposure. The site of cryoapplication was pre-treated with antiseptic solution and was selected in such a way, that no large vessels, nerves, energetic meridians and biologically active points were near it, as well as for cosmetic reasons. The cryoeffect was performed using a self-supporting cryoinstruments with 0.5 cm's sterile tip. Temperature regimen was determined by evaporation temperature of liquid nitrogen (–180÷–190°C), filled in the cryoinstrument. The control and main groups of patients were representative and similar by age, severity degree of hypothyrosis, state of medicamentous compensation. The dynamic observation was conducted in 3, 6 and 9 months.

The estimation of immune system was carried-out by 4 parameters (B-lymphocytes, AB-TG, AB-MSA, CIC), reflecting the state of the immunity humoral link. When interpreting the obtained results we used the data of similar investigation for the group of healthy persons, which was age- and sex representative (n=20).

The isolation of mononuclear cells was done in a ficoll-verografin gradient. When determining B-lymphocyte population there were used the monoclonal antibodies to the CD20 phenotypical marker (the norm is 6-18%), labelled with horse radish peroxidase (Sorbert Ltd, Russia) light microscope [12].

The antibodies to AB-TG and AB-MSA were revealed using the АИФ-С-01С immunoenzyme analyser (Belarus) for a quantitative determination of antibodies in blood serum by means of the method for indirect immunoenzyme analysis (the norm is 0-1.4), for the concentration of circulating immune complexes (CIC) in blood serum it was done using the selective precipitation method for antigen-antibody complexes in 3.75% polyethylene glycol with following photometric determination of precipitate density (the norm is 0-56 units).

The statistical analysis was performed with Biostatistica 4.03 software (USA). The normalcy of data distribution in the analysed samples was tested by a visual estimation of categorised histograms, Kolmogorov-Smirnov tests. Studying the influence strength ( $\eta^2$ ) of investigated factors, their combination and total effect, the estimation of general parameters of influence in the form of confidence limits ( $\eta^2$ ) on the indices of humoral immunity were conducted basing on the results of dispersion analysis of two-factor complex (F criterion) [10]. The gradations for cryoeffect factor were as follows: the absence of LDIC effect (the control group) and LDIC application (the main group). The gradations for time factor were as follows: the initial level, 3, 6 and 9 months of

Статистический анализ проводили при помощи пакета программы Biostatistica 4.03 (США). Нормальность распределения данных в анализируемых выборках проверяли по визуальной оценке категоризированных гистограмм, тестов Колмогорова-Смирнова. Изучение силы влияния ( $\eta^2$ ) исследуемых факторов, их сочетания и суммарного действия, оценка генеральных параметров влияния в форме доверительных границ ( $\eta^2$ ) на показатели гуморального иммунитета осуществляли на основании результатов дисперсионного анализа двухфакторного комплекса (критерий F) [10]. Градациями фактора криовоздействия были: отсутствие воздействия ЛДИК (контрольная группа) и применение ЛДИК (основная группа). Градациями фактора времени были: исходный уровень, 3; 6 и 9 мес наблюдения в обеих группах. При наличии достоверных различий между отдельными изучаемыми факторами проводилась оценка разности частных средних (градациями данного фактора). Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

При сравнении средних показателей процентного содержания В-лимфоцитов, значений титров АТ-ТГ и АТ-МСА и концентраций ЦИК у пациентов контрольной и основной групп (табл. 1 и 2) по отношению к группе здоровых лиц выявлены нарушения в гуморальном звене иммунитета. Сила влияния взаимодействия ЛДИК и фактора времени ( $F=9,82$ ;  $P<0,01$ ) составила;  $\eta^2=10,80\%$ ;  $\eta^2 - (10,8 \div 2,81)\%$ . Вследствие этого влияние криовоздействия на процентное содержание CD20<sup>+</sup>-клеток у больных основной группы в значительной степени определялось градацией фактора времени. Однако преобладание силы влияния ЛДИК  $\eta^2=25,40\%$ ;  $\eta^2 - (25,40 \div 1,83)\%$  над силой влияния фактора времени  $\eta^2=4,90\%$ ,  $\eta^2 - (4,90 \div 2,81)\%$  по отношению к силе влияния суммы факторов  $\eta^2=41,10\%$ ;  $\eta^2 - (41,10 \div 5,10)\%$  указывает на определяющую роль ЛДИК.

observation in both groups. At the presence of statistically significant differences between some studied factors we estimated the differences of quotient's means (with this factor gradations).

A critical level of significance (P) when testing the statistical hypotheses was assumed as equal to 0.05.

### Results and discussion

When comparing the average indices of B-lymphocyte percentage content, the AB-TG and AB-MSA titer values and CIC concentrations in patients of the control and main groups (Table 1 and 2) in respect of the group of healthy persons there were revealed the disorders in the immunity humoral link.

The influence strength of LDIC interaction and time factor ( $F=9.82$ ;  $P<0.01$ ) made:  $\eta^2=10.80\%$ ;  $\eta^2 -$

**Таблица 1.** Динамика изменений количества В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>) в контрольной и основной группах больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ, в зависимости от применяемого метода лечения (M±m), %  
**Table 1.** Dynamics of changes of B-lymphocyte amount (CD20<sup>+</sup>) in groups of patients with hypothyroidism, operated for AIT, depending on the applied treatment (M±m), %

Группа больных, срок наблюдения Group of patients, observation term		Достоверность Statistical significance	В – лимфоциты B – lymphocytes
Группа здоровых (n = 20) Group of healthy persons (n = 20)			12,65±0,71
Контрольная группа Control group	1 До лечения L – тироксином (n = 25) Before treatment with L – thyroxin (n = 25)		21,88±0,85*
	2 3 мес. после приема L – тироксина (n = 22) 3 months after L – thyroxin treatment (n = 22)	P <sub>1-2</sub>	25,00±0,86 <0,05
	3 6 мес. после приема L – тироксина (n = 17) 6 months after L – thyroxin treatment (n = 17)	P <sub>1-3</sub> P <sub>2-3</sub>	24,32±1,70 0,05 0,05
	4 9 мес. после приема L – тироксина (n = 21) 9 months after L – thyroxin treatment (n = 21)	P <sub>1-4</sub> P <sub>2-4</sub> P <sub>3-4</sub>	25,30±1,04 <0,05 0,05 0,05
Исследуемая группа Main group	5 До применения комплексного лечения (n = 25) Before applying a combined treatment (n = 25)	P <sub>1-5</sub>	21,52±1,08* 0,05
	6 3 мес. после применения комплексного лечения (n = 21) After 3 months of combined treatment (n = 21)	P <sub>5-6</sub> P <sub>2-6</sub>	17,81±0,87 <0,05 <0,001
	7 6 мес. после применения комплексного лечения (n = 19) After 6 months of combined treatment (n = 19)	P <sub>5-7</sub> P <sub>6-7</sub> P <sub>3-7</sub>	11,74±0,57 <0,001 <0,01 <0,001
	8 9 мес. после применения комплексного лечения (n = 18) After 9 months of combined treatment (n = 18)	P <sub>5-8</sub> P <sub>6-8</sub> P <sub>4-8</sub> P <sub>7-8</sub>	17,33±0,76 <0,0 0,05 <0,001 <0,01

**Примечание:** \* – P < 0,001 по сравнению со здоровыми лицами.  
**Note:** \* – P < 0.001 in comparison with healthy persons

**Таблица 2.** Динамика изменений показателей гуморального антитиреоидного иммунитета в контрольной и основной группах больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ, в зависимости от применяемого метода лечения ( $M \pm m$ )

**Table 2.** Dynamics of changes of humoral antithyroid immunity indices in groups of patients with hypothyroidism, operated for AIT depending on the applied treatment ( $M \pm m$ ), %

Группа больных, срок наблюдения Group of patients, observation term		Достоверность Statistical significance	АТ – ТГ АВ – ТГ	АТ – МСА АВ – МСА	ЦИК СІС	
Группа здоровых (n=20) Group of healthy persons (n=20)			1,05 ± 0,05	1,11 ± 0,05	40,25 ± 1,48	
Контрольная группа Control group	1	До лечения L – тироксином (n=25) Before treatment with L – thyroxin (n=25)		1,70 ± 0,05*	1,81 ± 0,04*	65,50 ± 3,98*
	2	3 мес. после приема L – тироксина (n=22) 3 months after L – thyroxin treatment (n=22)	$P_{1-2}$	2,87 ± 0,40 <0,01	2,79 ± 0,31 <0,01	80,37 ± 8,04 <0,05
	3	6 мес. после приема L – тироксина (n=17) 6 months after L – thyroxin treatment (n=17)	$P_{1-3}$ $P_{2-3}$	3,41 ± 0,47 <0,01 0,05	3,02 ± 0,35 <0,01 0,05	79,14 ± 7,27 <0,05 0,05
	4	9 мес. после приема L – тироксина (n=21) 9 months after L – thyroxin treatment (n=21)	$P_{1-4}$ $P_{2-4}$ $P_{3-4}$	2,94 ± 0,36 <0,01 0,05 0,05	2,92 ± 0,26 <0,01 0,05 0,05	84,19 ± 6,65 <0,05 0,05 0,05
Исследуемая группа Main group	5	До применения комплексного лечения (n=25) Before applying a combined treatment (n=25)	$P_{1-5}$	1,85 ± 0,08* 0,05	1,82 ± 0,04* 0,05	66,24 ± 3,28* 0,05
	6	3 мес. после применения комплексного лечения (n=21) After 3 months of combined treatment (n=21)	$P_{3-6}$ $P_{2-6}$	1,65 ± 0,10 0,05 <0,01	1,58 ± 0,06 0,05 <0,01	61,76 ± 2,43 0,05 <0,05
	7	6 мес. после применения комплексного лечения (n=19) After 6 months of combined treatment (n=19)	$P_{3-7}$ $P_{6-7}$ $P_{3-7}$	1,49 ± 0,09 0,05 0,05 <0,01	1,50 ± 0,08 0,05 0,05 <0,01	52,32 ± 1,85 <0,05 0,05 0,05
	8	9 мес. после применения комплексного лечения (n=18) After 9 months of combined treatment (n=18)	$P_{3-8}$ $P_{6-8}$ $P_{4-8}$ $P_{7-8}$	1,92 ± 0,20 0,05 0,05 <0,01 0,05	2,51 ± 0,16 <0,01 <0,01 0,05 <0,01	74,44 ± 4,59 0,05 0,05 0,05 <0,01

**Примечание:** \* –  $P < 0,001$  по сравнению со здоровыми лицами.

**Note:** \* –  $P < 0.001$  in comparison with healthy persons

При сравнении средних показателей процентного содержания В-лимфоцитов периферической крови больных контрольной и основной групп выявлены различия во все сроки наблюдения (табл. 2): снижение их у больных основной группы через 3 мес после применения ЛДИК с  $21,52 \pm 1,08$  до  $17,81 \pm 0,87\%$  ( $F=6,25$ ;  $P < 0,05$ ), через 6 мес до  $11,74 \pm 0,57\%$  ( $F=41,07$ ;  $P < 0,001$ ). Сохраняющееся сниженное по отношению к исходному уровню относительное количество В-лимфоцитов у больных основной группы через 9 мес после применения ЛДИК ( $F = 7,31$ ;  $P < 0,01$ ) и отсутствие отличий по сравнению с 3-м месяцем наблюдения ( $F=0,1$ ;  $P > 0,05$ ) указывают на постепенное прогрессирующее увеличение их количества, что можно связать с угасающим действием ЛДИК. Несмотря на это, содержание В-лимфоцитов оставалось сниженным по отношению к аналогичному сроку наблюдения в контрольной группе ( $F = 24,48$ ;  $P < 0,001$ ).

( $10,8 \div 2,81$ )%. Due to that, the cryoeffect influence on a percentage content of CD20<sup>+</sup>-cells in the main group's patients was in a great extent determined by the time factor gradation. However the predomination of LDIC influence strength  $\eta^2=25.40\%$ ;  $\eta^2 - (25.40 \div 1.83)\%$  over that of time factor  $\eta^2=4.980\%$ ;  $\eta^2 - (4.90 \div 2.81)\%$  in respect of the influence strength of the sum of factors  $\eta^2=41.10\%$ ;  $\eta^2 - (41.10 \div 5.10)\%$  designates the LDIC determining role.

When comparing the average indices of B-lymphocyte percentage content in peripheric blood in patients of the control and main groups the following differences were found out during all the observation terms (Table 2): their decrease in the main group's patients 3 months after LDIC application from  $21.52 \pm 1.08$  down to  $17.81 \pm 0.87\%$  ( $F=6.25$ ;  $P < 0.05$ ), in 6 months down to  $11.74 \pm 0.575$  ( $F=41.07$ ;  $P < 0.001$ ). The kept decreased relative B-lymphocyte number in respect of the initial level in the main group's patients

У больных контрольной группы выявлено увеличение относительного количества В-лимфоцитов через 3 и 9 мес наблюдения ( $F=4,18$ ;  $P<0,05$  и  $F=5,31$ ;  $P<0,05$  соответственно). Однако отсутствие изменений через 6 мес по отношению к исходному уровню ( $F=2,81$ ;  $P>0,05$ ), а также различий между моментами наблюдения указывает на то, что у больных контрольной группы количество В-лимфоцитов, увеличившееся через 3 мес, оставалось стабильно высоким, отражая высокую напряженность гуморального звена иммунитета.

Показателем интенсивности аутоиммунного процесса служит и уровень АТ-МСА, который определяет степень тиреоидной дисфункции и имеет прогностическое значение в развитии гипотиреоза [2]. В высшей степени достоверным оказалось влияние ЛДИК и фактора времени ( $F=38,19$ ;  $P<0,01$  и  $F=8,58$ ;  $P<0,01$  соответственно), их взаимодействия ( $F=5,24$ ;  $P<0,01$ ) и их суммарного действия ( $F=11,34$ ;  $P<0,01$ ) на значения индексов АТ-МСА в дисперсионном комплексе. Так, сила влияния ЛДИК на показатели индексов АТ-МСА составила  $\eta^2=15,90\%$ ;  $\eta^2 - (15,90 \div 1,50)\%$  от общего влияния всей суммы факторов  $\eta^2=33,10\%$ ;  $\eta^2 - (33,10 \div 5,60)\%$ , а незначительная сила влияния взаимодействия двух факторов  $\eta^2=6,60\%$ ;  $\eta^2 - (6,60 \div 3,10)\%$  и фактора времени  $\eta^2=10,80\%$ ;  $\eta^2 - (10,80 \div 3,10)\%$  по сравнению с силой влияния ЛДИК указывает на его определяющее влияние.

Из табл. 2 видно, что у больных контрольной и основной групп имеют место различия между средними значениями титров АТ-МСА через 3 и 6 мес наблюдения ( $F=19,75$ ;  $P<0,01$  и  $F=31,81$ ;  $P<0,01$  соответственно). У больных контрольной группы выявлено постепенное увеличение значения индекса АТ-МСА с  $1,81 \pm 0,04$  до  $2,92 \pm 0,26$  через 9 мес ( $F=21,92$ ;  $P<0,01$ ). Однако отсутствие различий между показателями 3-, 6- и 9-го месяцев наблюдения указывало на сохраняющиеся стабильно положительные значения индексов АТ-МСА по отношению к исходному уровню, что можно объяснить увеличением процентного содержания В-лимфоцитов и их активацией. В основной группе не было выявлено различий значений индексов АТ-МСА через 3 и 6 мес по сравнению с исходным уровнем. Следовательно, их значения оставались слабopоложительными. Через 9 мес у больных основной группы отмечено увеличение индекса АТ-МСА до положительного значения с  $1,82 \pm 0,04$  до  $2,51 \pm 0,16$  ( $F=6,72$ ;  $P<0,01$ ).

Выявлено влияние ЛДИК ( $F=31,78$ ;  $P<0,01$ ) и фактора времени ( $F=3,03$ ;  $P<0,05$ ) на значение индекса АТ-ТГ как основного признака лимфocитарного тиреоидита. Однако влияние взаимодействия фактора времени и ЛДИК ( $F=5,65$ ;  $P<0,01$ )

9 months after LDIC application ( $F=7.31$ ;  $P<0.01$ ) and the absence of differences in comparison with the 3rd month of observation ( $F=0.1$ ;  $P>0.05$ ) point to its gradual progressing increase, that can be related to a fading LDIC effect. In spite to this fact, B-lymphocyte content remained reduced in respect of the similar observation term in the control group ( $F=24.48$ ;  $P<0.001$ ).

In the control group's patients an increase in a relative B-lymphocyte number was revealed after 3 and 9 observation months ( $F=4.18$ ;  $P<0.05$  and  $F=5.31$ ;  $P<0.05$  correspondingly). However the absence of changes in 6 months in respect to the initial level ( $F=2.81$ ;  $P>0.05$ ), as well as no differences between the observation moments points to the fact, that in the control group's patients the number of B-lymphocytes, augmented in 3 months, remained at a stable high level, by reflecting the high tension in the immunity humoral link.

The AB-MSA level, determining the degree of thyroid dysfunction and having a forecasting value in hypothyrosis development, serves as the index for the autoimmune process intensity as well [2]. LDIC and time factor influence ( $F=38.19$ ;  $P<0.01$  and  $F=8.58$ ;  $P<0.01$ , correspondingly), their interaction ( $F=5.24$ ;  $P<0.01$ ) and total effect ( $F=11.34$ ;  $P<0.01$ ) on the AB-MSA indices in a dispersion complex occurred to be the most statistically significant. So, the LDIC influence strength on the AB-MSA indices made  $\eta^2=15.90\%$ ;  $\eta^2 - (15.90 \div 1.50)\%$  of the total influence of all sum of factors  $\eta^2=33.10\%$ ;  $\eta^2 - (33.10 \div 5.60)\%$ , but an insignificant influence strength of two factors interaction  $\eta^2=6.60\%$ ;  $\eta^2 - (6.60 \div 3.10)\%$  and time factor  $\eta^2=10.80\%$ ;  $\eta^2 - (10.80 \div 3.10)\%$  in comparison with LDIC influence strength indicates to its determining effect.

The Table 2 shows that in patients of the control and main groups there are the differences between mean average values of AB-MSA titers in 3 and 6 months of observation ( $F=19.75$ ;  $P<0.01$  and  $F=31.81$ ;  $P<0.01$ , correspondingly). In patients of the control group a gradual augmentation of AB-MSA index value from  $1.81 \pm 0.04$  up to  $2.92 \pm 0.26$  was revealed in 9 months ( $F=21.92$ ;  $P<0.01$ ). However the absence of differences between the indices of 3rd, 6th and 9th observation months indicated to the kept steadily positive values of AB-MSA indices in respect to the initial level, that can be explained by the augmentation of B-lymphocyte percentage content and their activation. No differences for AB-MSA index values were revealed in the main group 3 and 6 months later in comparison with the initial level. Consequently, their values remained slightly positive. After 9 months an increase in AB-MSA index up to the positive value from  $1.82 \pm 0.04$  to  $2.51 \pm 0.16$  ( $F=6.72$ ;  $P<0.01$ ) was observed in the main group's patients.

с силой влияния  $\eta^2=7,70\%$ ;  $\eta^2 - (7,70 \div 3,59)\%$  указывает на то, что анализ влияния каждого фактора без совместного анализа действия обоих факторов дает ложное заключение о проявляемой силе влияния, так как каждый из них может иметь большую силу влияния, но только при определённой градации другого фактора. Сила влияния ЛДИК составила  $\eta^2=14,50\%$ ;  $\eta^2 - (14,50 \div 1,80)\%$  от силы влияния суммы факторов  $\eta^2=26,30\%$ ;  $\eta^2 - (26,30 \div 6,47)\%$  и была значительно больше силы влияния фактора времени  $\eta^2=4,20\%$ , которая может составить ( $P=0,95$ ) не менее 0,61 и не более 7,79%.

Сравнение средних значений индексов АТ-ТГ у больных основной группы показало отсутствие различий между разными сроками после применения ЛДИК, то есть их значения на протяжении данного срока наблюдения оставались слабоположительными. У больных контрольной группы отмечено увеличение значения индекса АТ-ТГ через 3 мес с  $1,70 \pm 0,05$  до  $2,87 \pm 0,40$  ( $F=10,87$ ;  $P<0,01$ ) и так как отсутствовали различия между 3-, 6- и 9-м месяцам наблюдения, это значение оставалось стабильно положительным через 6 ( $F=17,91$ ;  $P<0,01$ ) и 9 мес ( $F=11,41$ ;  $P<0,01$ ) по отношению к значению исходного уровня. Выявленные различия между показателями значений индексов у больных контрольной и основной групп через 3; 6 и 9 мес наблюдения ( $F=10,92$ ;  $P<0,01$ ,  $F=27,63$ ;  $P<0,001$  и  $F=7,46$ ;  $P<0,05$  соответственно) указывают, что ЛДИК обладает тормозящим влиянием на образование АТ-ТГ у больных основной группы, опосредованное положительным влиянием на В-лимфоциты.

У больных контрольной и основной групп на изменение концентрации ЦИК оказывали в разной степени свое влияние ЛДИК, фактор времени ( $F=14,34$ ;  $P<0,01$  и  $F=3,09$ ;  $P<0,05$  соответственно), взаимодействие факторов ( $F=2,67$ ;  $P<0,05$ ) и их сочетание ( $F=4,43$ ;  $P<0,01$ ). Сила влияния фактора времени составила  $\eta^2=4,80\%$ ;  $\eta^2 - (4,80 \div 4,03)\%$  от силы влияния организованных факторов  $\eta^2=16,30\%$ ;  $\eta^2 - (16,30 \div 7,28)\%$  и была меньше силы влияния ЛДИК  $\eta^2=7,50\%$ ;  $\eta^2 - (7,50 \div 1,99)\%$ . Сила влияния взаимодействия ЛДИК и фактора времени  $\eta^2=4,20\%$  на показатели титров АТ-ТГ может составить ( $P=0,95$ ) не менее 0,17 и не более 8,23%.

Сравнение концентраций ЦИК между больными контрольной и основной групп показало наличие различий средних через 3 ( $F=6,58$ ;  $P<0,05$ ) и 6 мес наблюдения ( $F=13,87$ ;  $P<0,01$ ). У больных основной группы выявлено снижение концентрации ЦИК через 6 мес после применения ЛДИК ( $F=3,96$ ;  $P<0,05$ ) с  $66,24 \pm 3,28$  до  $52,32 \pm 1,85$  единиц с последующим увеличением до  $74,44 \pm 4,59$  единиц через 9 мес ( $F=8,59$ ;  $P<0,01$ ) по отношению к 6-му

There was revealed the influence of LDIC ( $F=31.78$ ;  $P<0.01$ ) and time factor ( $F=3.03$ ;  $P<0.05$ ) on the AB-TG index value as the main sign of lymphocyte thyroiditis. However the effect of time factor and LDIC interaction ( $F=5.65$ ;  $P<0.01$ ) with the influence strength  $\eta^2=7.70\%$ ;  $\eta^2 - (7.70 \div 3.59)\%$  points to the fact, that the influence analysis of each factor without combined analysis of both factors effect produces the falsity about the manifested influence strength, because each of them can have higher influence strength but only under certain gradation of another factor. The LDIC influence strength made  $\eta^2=14.50\%$ ;  $\eta^2 - (14.50 \div 1.80)\%$  of the influence strength of the sum of factors  $\eta^2=26.30\%$ ;  $\eta^2 - (26.30 \div 6.47)\%$  and was considerably higher than that of time factor  $\eta^2=4.20\%$ , which can make ( $P=0.95$ ) not less than 0.61 and not more than 7.79%.

The comparison of average values of AB-TG indices in patients of the main group demonstrated no differences between various terms after LDIC application, i.e. their values within this observation term remained slightly positive. In the control group's patients there was noted an increase in AB-TG index value in 3 months from  $1.70 \pm 0.05$  up to  $2.87 \pm 0.40$  ( $F=10.87$ ;  $P<0.01$ ) and as there were no differences between the 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> month of observation this value remained stable and positive in 6 ( $F=17.91$ ;  $P<0.01$ ) and 9 months ( $F=11.41$ ;  $P<0.01$ ) in respect of the initial level. The revealed differences between the value indices in patients of the control and main groups in 3, 6 and 9 months of observation ( $F=10.92$ ;  $P<0.01$ ,  $F=27.63$ ;  $P<0.001$  and  $F=7.46$ ;  $P<0.05$ , correspondingly) indicate to the fact, that LDIC has an inhibiting effect on AB-TG formation in the main group's patients, mediated by a positive effect on B-lymphocytes.

In patients of the control and main groups the LDIC, time factor ( $F=14.34$ ;  $P<0.01$  and  $F=3.09$ ;  $P<0.05$ , correspondingly), interaction of factors ( $F=2.67$ ;  $P<0.05$ ) and their combination ( $F=4.43$ ;  $P<0.01$ ) affected in a different extent the change in CIC concentration. The influence strength of time factor made  $\eta^2=4.80\%$ ;  $\eta^2 - (4.80 \div 4.03)\%$  of that for the organised factors  $\eta^2=16.30\%$ ;  $\eta^2 - (16.30 \div 7.28)\%$  and was lower than the LDIC influence strength  $\eta^2=7.50\%$ ;  $\eta^2 - (7.50 \div 1.99)\%$ . The influence strength of LDIC interaction with time factor  $\eta^2=4.20\%$  on the indices of AB-TG titers can make ( $P=0.95$ ) not less than 0.17 and not more than 8.23%.

The comparison of CIC concentrations between the patients of the control and main groups demonstrated the presence of differences for averages in 3 ( $F=6.58$ ;  $P<0.05$ ) and 6 months of observation ( $F=13.87$ ;  $P<0.01$ ). In the main group's patients there was revealed a decrease in CIC concentration 6 months after LDIC application ( $F=3.96$ ;  $P<0.05$ ) from

месяцу наблюдения. При этом отсутствовали различия средних концентраций ЦИК у больных контрольной и основной групп через 9 мес. В контрольной группе отмечено достоверное прогрессирующее увеличение концентрации ЦИК через 3 (F=4,46; P<0,05), 6 (F=4,06; P<0,05) и 9 мес наблюдения (F=7,45; P<0,01) с 65,60±3,98 до 84,19±6,65 единиц. Таким образом, ЛДИК обладает иммуномодулирующим эффектом и его применение у больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ, оказывает тормозящее влияние на антителообразование, опосредованное угнетением пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов на срок более 6 мес.

### Выводы

1. У больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ, имеет место напряженность гуморального звена иммунитета, которая характеризуется повышенным процентным содержанием В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>-клеток) в периферической крови, увеличенным образованием АТ-ТГ, АТ-МСА и ЦИК.

2. Применение ЛДИК у больных гипотиреозом, оперированных по поводу АИТ, оказывает тормозящее влияние на антителообразование на срок более 6 мес, опосредованное угнетением пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов.

3. Постепенное угасание иммуномодулирующего эффекта через 9 мес обуславливает необходимость применения ЛДИК повторно.

66.24±3.28 down to 52.32±1.85 units with following augmentation up to 74.44±4.59 units 9 months later (F=8.59; P<0.01) in respect of the 6<sup>th</sup> observation month. At the same time there were no differences in average CIC concentrations in patients of the control and main groups after 9 months. In the control group a statistically significant progressing increase in CIC concentration in 3 (F=4.46; P<0.05), 6 (F=4.06; P<0.05) and 9 observation months (F=7.45; P<0.01) from 65.60±3.98 to 84.19±6.65 units was noted.

Thus, LDIC has an immune modulating effect and its application in patients with hypothyrosis, operated for AIT, causes an inhibiting effect on antibody formation, mediated by suppression of proliferation and B-lymphocyte differentiation for the term more than 6 months.

### Conclusions

1. In patients with hypothyrosis, operated for AIT, there is the tension of immunity humoral link, characterising by an increased B-lymphocyte percentage content (CD20<sup>+</sup>-cells) in peripheric blood, an increased AB-TG, AB-MSA and CIC formation.

2. The LDIC application in patients with hypothyrosis, operated for AIT, causes an inhibiting effect on the antibody-formation for the term longer than 6 months, mediated by suppression of proliferation and B-lymphocyte differentiation.

3. A gradual fading of an immune modulating effect after 9 months stipulates the necessity for the repeated LDIC application.

### Литература

1. *Аристархов В.Г.* Тактика ведения больных с аутоиммунным тиреодитом // Современные аспекты хирургической эндокринологии: Материалы одиннадцатого (тринадцатого) Рос. симпозиума с международным участием по хирургической эндокринологии.— СПб: WELCOME, 2003.— Т.1.— С. 8-11.
2. *Булатова С.В., Постникова Т.В., Замараяев Г.Н., Бейкин Я.Б.* Анализ возрастной динамики тиреоидных аутоантител / Молекулярные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунотерапии: Материалы шестой Всерос. конференции с международным участием "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге, 2002" // Мед. иммунология.— 2002.— Т. 4, №2.— С. 192-193.
3. *Буянова А.В.* Морфологические основы реализации иммунного ответа в коже // Журн. дерматологии и венерологии.— 1999.— Т. 8, №2.— С. 46-49.
4. *Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Герасимов Г.А. и др.* Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечению аутоиммунного тиреодита у взрослых // Клин. тиреодология.— 2003.— Т. 1, №1.— С. 24-25.
5. *Донюков А.И.* Отдаленные результаты оперативных вмешательств на щитовидной железе при аутоиммунном тиреодите: Автореф. дис... канд. мед. наук.— Рязань, 2002.— 24 с.

### References

1. *Aristarkhov V.G.* Tactics for patient treatment with autoimmune thyroiditis // Current aspects of surgical endocrinology: Proceedings of the 11<sup>th</sup> (13<sup>th</sup>) Russian symposium with international participation on surgical endocrinology.— St-Petersburg: WELCOME, 2003.— Vol. 1.— P. 8-11.
2. *Bulatova S.V., Postnikova T.V., Zamarayev G.N., Bejkin Ya.B.* Analysis of age dynamics of thyroid autoantibodies/Molecular grounds of immune regulation, immune diagnosis and immune therapy: Proceedings of the 6<sup>th</sup> All-Russian conference with international participation "Days of immunology in St-Petersburg, 2002" // Meditsinskaya immunologiya.— 2002.— Vol. 4, N2.— P. 192-193.
3. *Buyanova A.V.* Morphological grounds of immune response realising in skin // Zhurnal dermatologii i venerologii.— 1999.— Vol. 8, N2.— P.46-49.
4. *Dedov I.I., Melnichenko G.A., Gerasimov G.A. et al.* Clinical recommendations of Russian Association of Endocrinologists on diagnostics and treatment of autoimmune thyroiditis in adults // Klinicheskaya tireoidologiya.— 2003.— Vol. 1, N1.— P. 24-25.
5. *Donyukov A.I.* Distant results of operative intrusions in thyroid gland at autoimmune thyroiditis: Author's abstract of thesis for obtaining the candidate of medical sciences degree.— Ryazan, 2002.— 24p.



6. *Калинин А.П., Потемкин Е.Е., Пешева Н.В.* Иммунологические аспекты аутоиммунного тиреоидита // Пробл. эндокринологии.– 1994.– №1.– С. 56-57.
7. *Караченцев Ю.И.* Індукційна кріотерапія в лікуванні аутоімунного тиреоїдиту // Вісник наукових досліджень.– 2000.– №3.– С. 23-25.
8. *Макаренкова В.П., Кост Н.В., Щурин М.Р.* Система дендритных клеток: роль в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний // Иммунология.– 2002.– Т. 23, №2.– С. 68-75.
9. *Пащенко М.В., Пинегин Б.В.* Основные свойства дендритных клеток // Иммунология.– 2001.– №4.– С. 7-15.
10. *Плохинский Н.А.* Биометрия.– Новосибирск: Изд-во Сиб. отделения АН СССР, 1961.– 315 с.
11. *Соколов Е.И.* Клиническая иммунология: Руководство для врачей / Под. ред. Е.И. Соколова.– М.: Медицина, 1998.– 285 с.
12. *Чередеев А.Н., Горлина Н.К., Козлов И.Г.* CD-маркеры в практике клинико-диагностических лабораторий // Клиническая лабораторная диагностика.– 1999.– №6.– С. 25-32.
6. *Kalinin A.P., Potemkin E.E., Pesheva N.V.* Immunological aspects of autoimmune thyroiditis // Problemy endokrinologii.– 1994.– N1.– P. 56-57.
7. *Karachentsev Yu.I.* Induced cryotherapy in autoimmune thyroiditis treatment // Visnyk naukovykh doslidzhen'.– 2000.– N3.– P. 23-25.
8. *Makarenkova V.P., Kost N.V., Schurin M.R.* System of dendrite cells: the role in immunity induction and pathogenesis of infectious, autoimmune and oncological diseases // Immunologiya.– 2002.– Vol. 23, N2.– P. 68-75.
9. *Paschenkova M.V., Pinegin B.V.* Main properties of dendrite cells // Immunologiya.– 2001.– N4.– P. 7-15.
10. *Plokhinsky N.A.* Biometry.- Novosibirsk: Publishing House of Siberian Department of Academy of Sciences of USSR, 1961.– P. 315.
11. *Sokolov E.I.* Clinical immunology: Manual for physicians / Edited by E.I. Sokolov.– Moscow: Meditsina, 1998.– 285 p.
12. *Cheredeyev A.N., Gorlina N.K., Kozlov I.G.* CD-markers in practice of clinical and diagnostic laboratories // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.– 1999.– N6.– P. 25-32.

*Accepted in 28.09.2004*

*Поступила 28.09.2004*