

УДК 577.2

©Коллектив авторов

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЦИТАРНОГО ТИРЕОИДИТА

Э.М. Биктагирова^{1}, Л.И. Саттарова², Г.Р. Вагапова³, Ю.В. Скибо¹, Е.Н. Чухловина¹,
О.А. Кравцова¹, З.И. Абрамова¹*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт фундаментальной медицины и биологии,
г. Казань, ул. Кремлевская, 18; тел.: 8(843)292-44-48; эл. почта: elnarabik@gmail.com

²Межрегиональный клинико-диагностический центр, г. Казань,
ул. Карбышева, 12а; тел.: 8(843)291-10-47; эл. почта: icdc@icdc.ru

³Казанская государственная медицинская академия “Росздрава”,
г. Казань, ул. Муштары, 11; тел.: 8(843)238-54-13; эл. почта: ksma@mi.ru

Изучена корреляционная зависимость между биохимическими и иммунологическими маркерами программируемой клеточной гибели (апоптоза) и функциональным состоянием щитовидной железы (гипер-, эу-, гипотиреоз) при хроническом лимфоцитарном тиреоидите (ХЛТ). В качестве основных маркеров были выбраны аннексин V, TRAIL и TNF- α , а также ДНК-гидролизующие антитела (АТ). Установлено повышение уровня TRAIL в сыворотке крови у больных ХЛТ (гипертиреоз>гипотиреоз>эутиреоз) по сравнению со здоровыми. Наиболее часто встречаются антитела к денатурированной ДНК (АТ-дДНК) (у 97% больных ХЛТ) по сравнению с контролем. Из них у 75% при гипертиреозе, 85% при гипотиреозе, 84,7% при эутиреозе. Активность АТ с гидролизующей активностью обнаруживает корреляционную зависимость с явлениями дисфункции щитовидной железы.

Ключевые слова: апоптоз, аутоантитела, антитела к ДНК, абзимы, антитела к компонентам тиреоидной ткани, хронический лимфоцитарный тиреоидит

DOI 10.18097/PBMC20166204458

ВВЕДЕНИЕ

В данном исследовании основное внимание уделено изучению некоторых биохимических и иммунологических маркеров, связанных с проблемой нарушения процесса программируемой клеточной гибели, в частности апоптоза, как одного из главных факторов развития аутоиммунного заболевания щитовидной железы (ЩЖ), – хронического лимфоцитарного тиреоидита (ХЛТ). Это одно из наиболее распространенных заболеваний ЩЖ, которое было взято в качестве модели для изучения особенности программируемой клеточной гибели (апоптоза). Данная патология характеризуется формированием нескольких вариантов, которые различаются как по функциональному состоянию ЩЖ (гипотиреоз, эутиреоз, гипертиреоз), так и её структуре (атрофия, гипертрофия, узлообразование). Исследования последних десятилетий указывают на мультифакторную природу данного заболевания [1], развивающегося в результате комплексного взаимодействия генетической предрасположенности, триггерных факторов, а также эндогенных механизмов.

Есть доказательство того, что апоптоз тиреоцитов при ХЛТ индуцирован антителами (АТ) [2] как к компонентам тиреоидной ткани, так и к аутоантигенам в составе апоптотических телец [3]. Ведущая роль в апоптозе тиреоцитов отводится Т и В лимфоцитам и сигналам, активирующим рецепторы тиреотропного гормона [2].

Рядом авторов показано, что маркерами нарушений функционирования иммунной системы,

индуцирующих развитие и прогрессирование аутоиммунных заболеваний, являются аутоантитела к ДНК (АТ-ДНК), которые, вероятно, и приводят к деструкции тканей и органов, нарушая уровень физиологического апоптоза [4, 5]. Различия в клинико-иммунологической картине ХЛТ, видимо, связаны с феноменом гетерогенности АТ [4], обладающих различными уровнями специфичности. Тем не менее, до настоящего времени нет единой точки зрения относительно причин и характера иммунных сдвигов, приводящих к утрате контроля над образованием АТ и появлением, с одной стороны, абзимов с каталитическим и цитотоксическим эффектом, а с другой – АТ-ДНК, лишённых указанных свойств.

Интерес к апоптозу обусловлен тем, что механизм его дисрегуляции в условиях реализации аутоиммунитета ещё недостаточно исследован [6, 7].

Необходимость понимания клинической значимости характера аутоиммунного процесса при ХЛТ в рамках комплексной оценки биохимических факторов нарушения аутоиммунитета, особенно в регионах с йоддефицитным состоянием, к которым относится и Республика Татарстан, определила актуальность нашего исследования.

В связи с вышеизложенным, было целесообразным охарактеризовать уровень специфических (аннексин V, TRAIL и TNF- α) и неспецифических (АТ к нативной и денатурированной ДНК, определение их ДНК-гидролизующей активности) маркеров апоптоза в группах больных ХЛТ с различной клинико-иммунологической картиной (эу-, гипо- и гипертиреоз) и условно здоровых лиц.

МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили образцы сыворотки венозной крови 298 женщин: группа больных с диагнозом ХЛТ составила 161 женщина в возрасте от 20 до 60 лет, группа контроля – 137 условно здоровых доноров без аутоиммунной патологии.

Диагноз ХЛТ устанавливали на основании результатов ультразвукового исследования и оценки функционального состояния ЩЖ, по содержанию тиреотропного гормона, свободного тироксина и свободного трийодтиронина и определения титра АТ к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) и тиреоглобулину (АТ-ТГ) в сыворотке крови. Степень активности аутоиммунного процесса оценивали по концентрации АТ к ТПО в сыворотке крови.

Дополнительным критерием при постановке диагноза служили данные по иммунофенотипированию лимфоцитов (определение на поверхности лимфоцитов венозной крови маркеров дифференциации (CD4⁺/CD8⁺)), полученные методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США) с применением пакетного анализа MultiSet™ и коммерческого набора MultitestIMKKit (“Becton Dickinson”).

Как больные ХЛТ, так и лица группы контроля, представляли собой смешанную популяцию РТ и не состояли друг с другом в кровном родстве. Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

Определение уровня аннексина V, TNF-α и TRAIL в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов согласно инструкции фирмы-производителя (“Bender MedSystem”, Австрия). Регистрацию продуктов проводили на спектрофотометре Awareness technology INC stat fax-2100 (США) в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Определение уровня антител к нативной (АТ-нДНК) и к денатурированной ДНК (АТ-дДНК) проводили методом ИФА, используя геномную ДНК (Human Genomic DNA, “Promega”, США) [8]. Регистрацию продуктов проводили на спектрофотометре Awareness technology INC stat fax-2100 в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Определение ДНКазной активности антител к ДНК проводили в реакции *in vitro*, используя в качестве субстрата коммерческий препарат ДНК плазмиду pBR322 штамма *E. Coli XL-1Blue* (“СибЭнзим”, Россия). Реакцию гидролиза проводили при 37°С, отбирая пробы через кратные промежутки времени. ДНК-гидролизующую активность в препаратах АТ оценивали по превращению сверхспирализованной плазмидной ДНК (ссДНК) в релаксированную кольцевую или линейную форму с использованием для визуализации результатов метода электрофореза в геле агарозы с последующей визуализацией бромистым этидием с использованием геля документирующей системы ChemiDoc™XRS (Bio-Rad Laboratories”, США).

Для статистического анализа полученных данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса, с поправкой Бонферрони. Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена [9]. Статистическую обработку выполняли с помощью пакета программ “Excel Office 2003”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одним из интегративных критериев патологии ЩЖ, в частности, ХЛТ, является обнаружение специфических антитиреодных АТ, таких как АТ-ТГ и АТ-ТПО [10]. В нашем исследовании повышение титров АТ-ТГ и АТ-ТПО (Ме 462,2 (2,5П 1,45; 97,5П 3150) и Ме 382,6 (2,5П 1;97,5П 1050) мЕд/мл, соответственно) имела место у всех больных ХЛТ. Дополнительным критерием при характеристике ХЛТ служат данные по иммунофенотипированию лимфоцитов (определение на поверхности Т-лимфоцитов маркеров дифференциации (CD4⁺/CD8⁺)).

В ходе анализа показано достоверное увеличение доли субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов в группе больных ХЛТ на фоне значительного снижения доли субпопуляции Т-супрессоров. по сравнению со здоровыми (p<0,05). Среднее соотношение Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ у больных было в два раза выше (Ме 2,05, ДИ 1,22-0,89) по сравнению с группой здоровых лиц (Ме 0,99, ДИ 0,009-0,01) (рис. 1).

Исследованиями ряда авторов [4, 5] было показано присутствие в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями ЩЖ ДНК-связывающих АТ, проявляющих ДНКазную активность. В связи с этим, мы провели анализ уровней антител к ДНК (нДНК и дДНК) в группе больных ХЛТ по сравнению с контрольной группой (табл. 1), а также ассоциированную с АТ ДНК-гидролизующую активность в зависимости от функционального состояния ЩЖ.

Таблица 1. Уровни циркулирующих антител к нДНК (АТ-нДНК) и дДНК (АТ-дДНК) в группе больных хроническим лимфоцитарным тиреоидитом и в контрольной группе

Выборка (n)	АТ-нДНК, оп.ед.		АТ-дДНК, оп.ед.	
	М±SD	95% ДИ	М±SD	95% ДИ
Больные (161)	0,89±0,25	0,2-0,5	0,94±0,33¹	0,34-0,41
Группа здоровых (137)	0,84±0,18	0,16-0,48	0,79±0,19	0,23-0,34

Примечание. Здесь и в таблице 2 результаты представлены в виде средней величины (М) ± стандартное отклонение (SD); 1 - достоверность различий (p<0,05) по сравнению с контрольной группой.

Установлено достоверное увеличение АТ к дДНК у 97% больных ХЛТ по сравнению с контролем (p=0,001, 95% ДИ 0,34-0,41). Из них у 75% при гипертиреозе, 84,7% – эутиреозе и 85% при гипотиреозе. В общей выборке больных ХЛТ обнаружена тенденция к увеличению АТ к нДНК, не достигшая уровня достоверности.

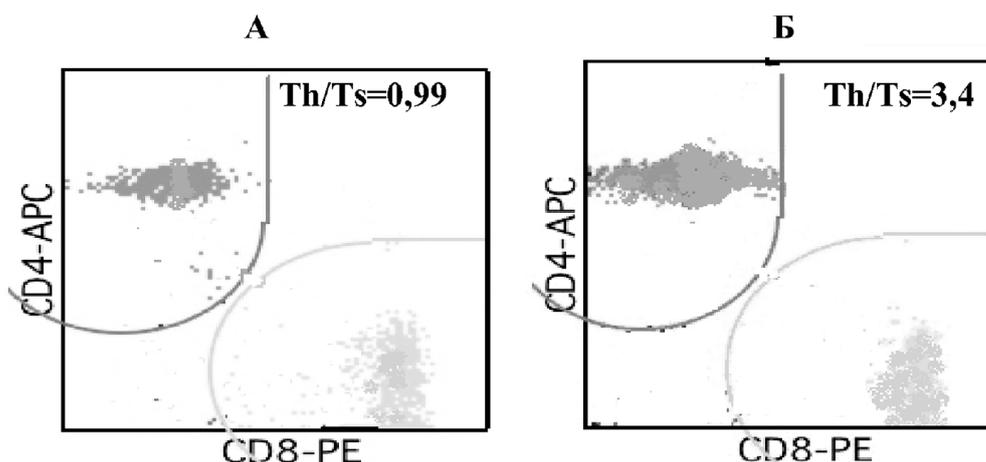


Рисунок 1. Характеристика состава циркулирующих Т-лимфоцитов в крови здоровых лиц и у больных хроническим лимфоцитарным тиреозом. Иммунофенотипирование Т-лимфоцитов по содержанию Т-хелперов (Th) (CD4⁺-APC) и Т-супрессоров (Ts) (CD8⁺-PE) в крови у здоровых лиц (А) и у больных ХЛТ (Б). APC- и PE-типы красителей моноклональных антител, конъюгированных с флюоресцентной меткой для определения мембранных и цитоплазматических антигенов клетки.

При изучении ДНК-гидролизующей активности АТ закономерно встает вопрос о принадлежности каталитических свойств собственно антителам [4]. Известно, что активность сывороточных ДНКаз термолabile и инактивируется при нагревании до 56°C [11], поэтому для исключения возможного влияния сывороточных ДНКаз на гидролиз плазмидной ДНК, сыворотки крови здоровых лиц, больных ХЛТ, предварительно прогревали при +56°C в течение 40 мин. После прогревания сыворотки крови доноров утрачивали способность превращать субстрат – ссДНК рBR322 (I форма) – в кольцевую (II форма) и линейную (III форма) формы.

Как следует из рисунка 2, обнаружены АТ с различной специфичностью к ДНК-субстрату (рBR322) и ДНК-гидролизующей активностью в зависимости от функционального состояния ЩЖ.

Основной пул АТ сыворотки крови больных ХЛТ с гипертиреозом представлен АТ с ДНК-гидролизующей активностью, специфичной к единичному разрыву ДНК в суперскрученной молекуле рBR322. Нарастание релаксированной кольцевой формы ДНК рBR322 происходило на протяжении 24 ч реакции гидролиза субстрата. Полученные при этом релаксированные кольцевые молекулы ДНК (форма II) более устойчивы к действию ДНК-гидролизующей активности АТ, так как добавление избыточной концентрации антител в сыворотке не приводило к полному переходу релаксированной кольцевой формы в линейную (форма III).

При гипотиреозе пул АТ, циркулирующих в сыворотке крови, представлен АТ, которые обладали более высокой гидролитической активностью: через 2 ч 50% ссДНК была гидролизирована до релаксированной кольцевой формы, в то время как при гипертиреозе 50% ссДНК было гидролизировано через 7 ч инкубации.

Через 12 ч инкубации начинали появляться продукты гидролиза в виде линейной ДНК (форма III)

на фоне снижения количества релаксированной кольцевой ДНК.

Наибольший интерес представлял пул АТ, циркулирующих в крови больных ХЛТ с эутиреозом. Как следует из денситограммы рисунка 2б, происходит образование трех групп продуктов гидролиза рBR322: в виде кольцевой релаксированной ДНК (формы II), в виде линейной ДНК (формы III), в виде дискретных фрагментов, величина которых уменьшалась по мере инкубации (рис. 2б – см. 12 и 24 ч). Это свидетельствует о том, что в сыворотке могут присутствовать АТ с различной способностью к гидролизу плазмидной ДНК в определенных участках. Можно предположить, что есть два пула АТ: АТ специфичные к однонитевым разрывам в участке напряжения суперспиральной ДНК и АТ с ДНК-гидролизующей активностью, специфически расщепляющие двунитевую ссДНК.

Следует отметить, что ДНК-гидролизующая активность АТ, специфичных к однонитевой ДНК, в сыворотке крови больных ХЛТ с эутиреозом ниже, по сравнению с ДНК гидролизующей активностью АТ сыворотки крови больных с гипер- и гипотиреозом, поскольку скорость нарастания продуктов гидролиза релаксированной кольцевой ДНК ниже. Можно предположить, что на релаксированную кольцевую форму плазмидной ДНК ДНК-гидролизующие АТ сыворотки крови больных эутиреозом не действуют, возможно, из-за их низкой активности, по сравнению с пулом АТ при гипотиреозе [12, 13].

С другой стороны, к 8 ч ДНК-гидролизующей реакции суперспиральная ДНК (по данным электрофореза) полностью гидролизирована, с чем может быть связано появление дискретных линейных фрагментов ДНК.

Таким образом, изменение степени гидролитической активности АТ к ДНК и их субстратной специфичности у больных ХЛТ может являться отражением динамики и степени выраженности аутоиммунного процесса.

НАРУШЕНИЕ АПОПТОЗА ПРИ ХЛТ

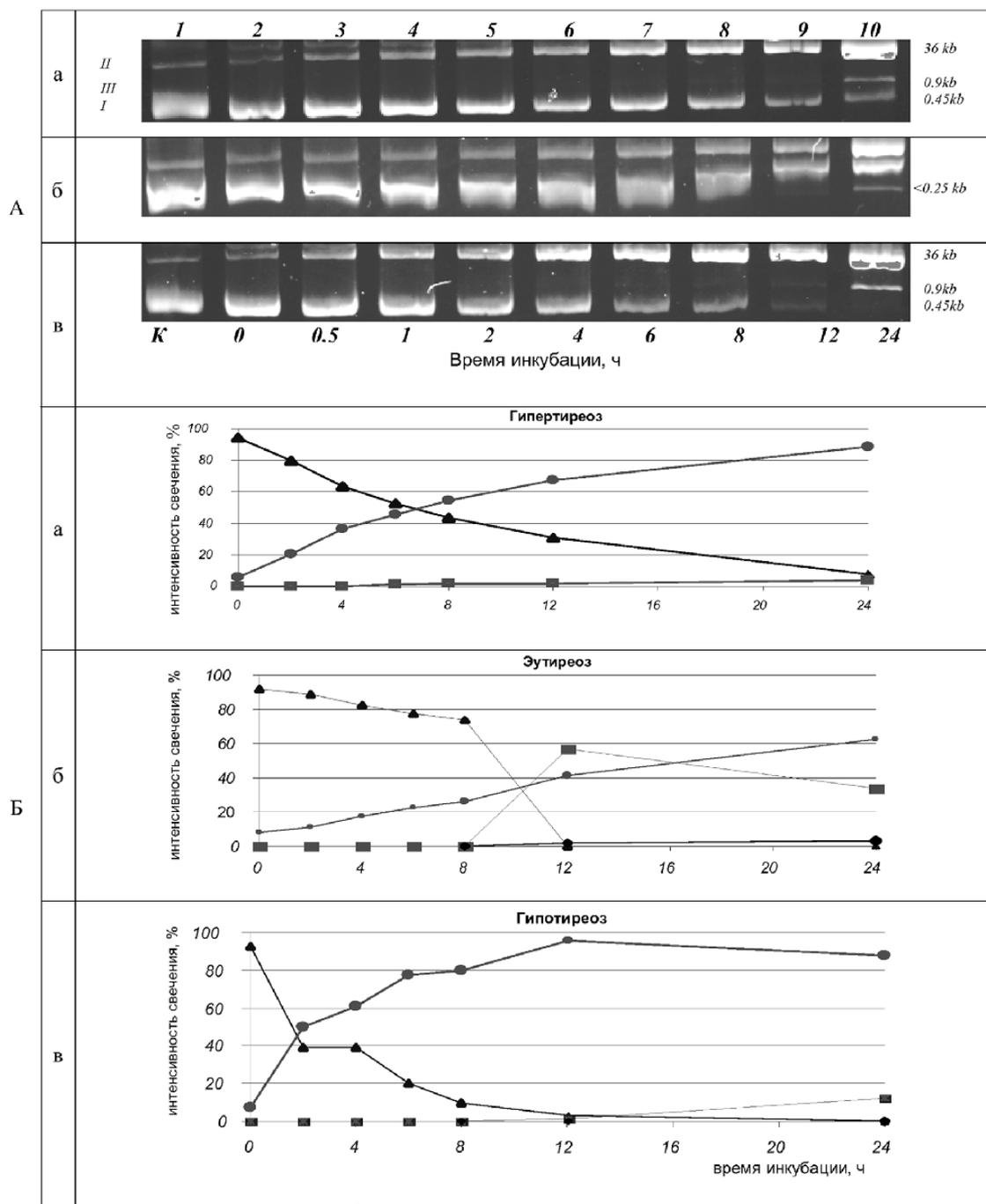


Рисунок 2. Характеристика ДНК-гидролизующей способности циркулирующих антител сыворотки больных хроническим лимфоцитарным тиреоидитом в зависимости от физиологического состояния щитовидной железы (А - электрофореграмма, Б - денситограмма). А - Дорожки: 1 - контроль (субстрат рВR322 + гидролизующий буфер ТЕ (0,025 М Трис-НСl буфер, рН=7,5)), 2-10 - субстрат рВR322 + сыворотка больного ХЛТ (а - с гипертиреозом, б - с эутиреозом, в - с гипотиреозом) (I-, II-, III- формы ДНК рВR322, соответственно), параметры электрофореза - 0,8% агарозный гель, рабочее напряжение 80 В; Б - Денситограмма степени гидролиза ДНК рВR322 циркулирующими антителами сыворотки крови больного ХЛТ (▲ - суперспиральная, ● - кольцевая, ■ - линейная, ◆ - короткие олигонуклеотиды). Представлены результаты типичного эксперимента.

По результатам анализа в общей группе больных ХЛТ установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем АТ-ТГ и АТ-нДНК ($R_s=0,38$, $p<0,05$), и обратная – между уровнем АТ-ТПО и АТ-дДНК ($R_s=0,2$, $p<0,05$). Между уровнем АТ-дДНК и АТ-ТГ, а также АТ-нДНК и АТ-ТПО корреляционной зависимости не выявлено.

При проведении корреляционного анализа в группах больных ХЛТ, разделенных в зависимости от функционального состояния ЩЖ (гипо-, эу- и гипертиреоз), обнаружен различный характер корреляционной зависимости между специфическими и неспецифическими АТ. Так, при гипертиреозе обнаружена прямая корреляционная зависимость

высокой степени между уровнем АТ-ДНК, как к нативной, так и денатурированной ДНК, и уровнем АТ-ТГ и АТ-ТПО. В состоянии гипотиреоза наблюдалась прямая корреляционная зависимость средней степени между АТ-нДНК и АТ-ТГ, и обратная – между АТ-дДНК и АТ-ТГ, а при эутиреозе усиливалась обратная корреляция между АТ-нДНК и АТ-дДНК, с одной стороны, и АТ-ТПО – с другой.

Физиологическое состояние ЩЖ связано с процессом апоптоза. Биохимические изменения при апоптозе включают транслокацию фосфатидилсерина (ФС) с внутренней стороны плазматической мембраны на внешнюю. Связываясь с ФС на поверхности клетки, аннексин V, конъюгированный с флуорохромом, также служит маркером апоптоза [14]. Нами установлено отсутствие значимых различий в содержании аннексина V в сыворотке крови больных ХЛТ с разным функциональным состоянием ЩЖ и контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2. Уровни маркеров апоптоза в сыворотке крови больных хроническим лимфоцитарным тиреоидитом, в зависимости от функционального состояния щитовидной железы

ХЛТ	M±SD		
	Аннексин V, пг/мл	TNF-α, пг/мл	TRAIL, нг/мл
Гипертиреоз	0,258±0,0012	6,8±1,02	60,2±20,07¹
Гипотиреоз	0,257±0,0014	2±13,18	45,5±19,3
Эутиреоз	0,257±0,0014	3,05±18,44	41,6±14,7
Контроль	0,258±0,001	1,89±16,48	39,38±11,6

Достоверное повышение уровня TRAIL установлено в сыворотке крови больных ХЛТ с гипертиреозом по сравнению с группой здоровых лиц. Необходимо отметить тенденцию к снижению уровня TRAIL в сыворотке крови больных ХЛТ в зависимости от функционального состояния ЩЖ: гипертиреоз>гипотиреоз>эутиреоз и разброс индивидуальных показателей уровня TRAIL у больных ХЛТ с гипотиреозом и эутиреозом.

Корреляционный анализ между уровнями TRAIL и аннексина V в общей выборке больных ХЛТ выявил прямую корреляционную зависимость слабой степени ($R_s=0,07$) ($p<0,05$). Мы обнаружили тенденцию к повышению содержания TNF-α в сыворотке крови больных ХЛТ (не достигшую уровня статистической достоверности, $p>0,05$). Максимальное повышение уровня TNF-α в сыворотке крови при ХЛТ отмечалось у пациентов с гипертиреозом. Кроме того наблюдалась высокая степень разброса индивидуальных показателей TNF-α при гипотиреозе (95% ДИ 0,99-5,61) и эутиреозе (95% ДИ 2,59-5,9).

ОБСУЖДЕНИЕ

По современным представлениям, ХЛТ рассматривается как заболевание, обусловленное генетическим дефектом Т-супрессоров, что приводит

к их взаимодействию с В-лимфоцитами, которые индуцируют синтез аутоантител (АТ-ТГ, АТ-ТПО) [15]. По данным Weetman с соавт., центральным патогенетическим звеном в развитии аутоиммунных эндокринных заболеваний служит дефицит Т-лимфоцитов супрессоров ($CD8^+$) и активация Т-хелперов ($CD4^+$) [16].

Выявленный нами дисбаланс $CD4^+/CD8^+$ -лимфоцитов при ХЛТ показывает, что в патогенезе данного заболевания важную роль играют нарушения в Т-клеточном звене иммунной системы. Это может выражаться её гиперактивацией, в частности, через изменения уровня специфических и неспецифических АТ в сыворотках больных ХЛТ, так как есть доказательства, что апоптоз тиреоцитов индуцируется АТ как к компонентам тиреоидной ткани, так и АТ к компонентам апоптолитических телец. В качестве чувствительного, но неспецифического скрининга ХЛТ, используется выявление АТ к ДНК [17, 18].

При ХЛТ нарушение функции ЩЖ может характеризоваться гипер-, эу-, и гипотиреозом. Гипертиреоз обусловлен деструкцией тиреоцитов, приводящей к высвобождению избыточного количества периферических тиреоидных гормонов. В последующем возникает период эутиреоза, а затем постепенно развивается гипотиреоз [19].

Оценивая уровень неспецифических АТ в зависимости от функционального состояния ЩЖ у больных ХЛТ, мы установили тенденцию к увеличению АТ-нДНК ($p>0,05$) и достоверное повышение АТ-дДНК по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). При этом, преобладание АТ-дДНК отмечено в группах с эу- и гипотиреозом (84,7% и 85% соответственно), и у 75% больных в состоянии гипертиреоза.

Данные о взаимовлиянии органоспецифических (АТ-ТГ, АТ-ТПО) и неспецифических (АТ-ДНК) АТ и их комплексной диагностической значимости, особенно при различных клинических вариантах течения ХЛТ, немногочисленны. По результатам анализа в общей группе больных ХЛТ установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем АТ-ТГ и АТ-нДНК, и обратная – между уровнем АТ-ТПО и АТ-нДНК; не установлено корреляционной зависимости между уровнем содержания АТ к дДНК и специфическими антитиреоидными АТ.

Таким образом, полученные данные о корреляции уровня специфических АТ к ткани ЩЖ и неспецифических АТ-ДНК, весьма интересны, так как и те и другие являются не только показателями активности, но и генерализации АИЗ.

Ранее Pedro с соавт., изучая содержание АТ-ДНК при болезни Грейвса (БГ) и ХЛТ в стадии эутиреоза, обнаружили АТ-нДНК у 50% больных ХЛТ с эутиреозом и у 82% пациентов с БГ. Встречаемость АТ-дДНК составила 90% от общей выборки (ХЛТ и БГ), – из них – 75% у больных ХЛТ [20]. Результаты наших исследований сыворотки крови больных ХЛТ также показали преобладание пула АТ-дДНК.

Предполагается, что в процессе аутоиммунизации к геномной ДНК первыми из общего пула сывороточных АТ образуются АТ-дДНК, но в дальнейшем по мере накопления соматических мутаций среди АТ-продуцирующих В-лимфоцитов наблюдается процесс созревания специфичности АТ в направлении от анти-дДНК к анти-нДНК [21, 22]. Следовательно, определение АТ-дДНК позволяет выявить возникновение заболевания в более ранние сроки [22]. Считается, что АТ-ДНК, обладающие каталитическими свойствами ферментов гидролаз, способны выступать в роли мощного регулятора апоптоза, скорость которого при ХЛТ многократно увеличивается [4, 5].

Скрининг образцов сывороток крови больных ХЛТ на наличие АТ с ДНК гидролизующей активностью (рис. 2) указывает на гетерогенность субстратной специфичности циркулирующих антител к ДНК в зависимости от физиологического состояния ЩЖ и уровень их активности. То есть, гидролитическая активность может влиять на функциональное состояние ЩЖ в процессе течения заболевания и апоптоз тироцитов.

Наибольший интерес вызывает регулирующее влияние на апоптоз биологически активных веществ, прежде всего цитокинов (Fas, TRAIL, TNF- α и др.) [6]. Причём, TRAIL опосредует как апоптоз тироцитов, так и цитотоксических аутореактивных лимфоцитов [23]. TNF- α является гомологом FasL, что свидетельствует о его высокой апоптогенной активности [24]. В связи с этим, нами охарактеризован процесс апоптоза на основании количественной оценки трёх специфических маркеров: аннексин V, TNF- α , TRAIL. Аннексин A5, как и другие аннексины, не выделяется из нормальных клеток; источником внеклеточного аннексина A5 являются разрушенные клетки. Одним из ранних признаков апоптоза служит экспозиция на клеточной мембране ФС. Этот процесс является неотъемлемой частью апоптоза, независимо от типа клеток и пускового механизма активации программы клеточной гибели. Данные литературы об индукции апоптоза неоднозначны. Ранее было показано с одной стороны, отсутствие отличий в индукции апоптоза клеток лимфоцитов у больных ХЛТ с эутиреозом и здоровых лиц, с другой стороны, отмечено достоверное снижение индукции апоптоза в 4 раза при гипотиреозе, и в 2 раза при гипертиреозе [25].

Исследователи отмечают, что в ЩЖ больных ХЛТ количество тироцитов, претерпевающих апоптоз, повышено [26]. Нами не было установлено значимых различий в содержании аннексина V в сыворотке крови больных ХЛТ с разным функциональным состоянием ЩЖ и контрольной группы здоровых лиц, что может свидетельствовать о нормальном, с физиологической точки зрения, течении процесса апоптоза при ХЛТ.

Ключевыми молекулами апоптоза являются так называемые рецепторы смерти (death receptors), которые передают внутрь клетки сигналы, поступающие в виде лигандов смерти. Согласно модели рецептор-опосредованной апоптотической

гибели клеток ЩЖ при ХЛТ, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) индуцирует апоптоз посредством рецепторов DR-4,-5. Зрелые Т-лимфоциты приобретают чувствительность к TRAIL-зависимому апоптозу после воздействия интерлейкина 2, что говорит о роли TRAIL в контроле иммунных реакций. Кроме того, показано возрастание чувствительности клеток к данному типу апоптоза у пациентов с некоторыми аутоиммунными патологиями [27].

По результатам наших исследований, показано достоверное повышение уровня TRAIL в сыворотке крови у больных ХЛТ с гипертиреозом по сравнению со здоровыми лицами. Обращает на себя внимание выявленная тенденция к снижению уровня TRAIL в сыворотке крови больных ХЛТ с разным функциональным состоянием ЩЖ: гипертиреоз>гипотиреоз>эутиреоз.

Повышение концентрации TRAIL и TNF- α в сыворотке крови как маркера некробиотических состояний было обнаружено рядом авторов [28, 29]. Некроз всегда обусловлен грубой патологией. Гибель клеток в процессе некроза связана с нарушениями в мембране или цитоплазме клеток и не затрагивает, существенно, клеточное ядро. Причина – атака клетки антителами и комплементом; гибель клеток мишеней под влиянием зрелых CD8⁺ Т клеток.

Выше были представлены данные о дефиците Т-лимфоцитов супрессоров (CD8⁺), что является центральным патогенетическим звеном в развитии аутоиммунных эндокринных заболеваний на фоне активации Т-хелперов (CD4⁺) в общей выборке больных ХЛТ [30]. Это позволяет предположить, что соотношение апоптоз/некроз определяет функциональное состояние ЩЖ при ХЛТ (гипертиреоз>гипотиреоз>эутиреоз). Так, наиболее высокие показатели TRAIL, полученные у больных ХЛТ с гипертиреозом, могут отражать преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами у этой группы пациентов. С другой стороны, более низкое содержание TRAIL в сыворотке крови у больных с гипо- и эутиреозом может свидетельствовать об интенсивности образования DR-5, который активно связывает TRAIL в связи с чем снижается его концентрация в сыворотке крови. В результате индукции TRAIL-опосредованного апоптоза происходит гибель тироцитов.

TNF- α может регулировать как апоптоз [6], так и некроз, включая определённые внутриклеточные сигнальные пути [31].

Нами обнаружена тенденция к повышению содержания TNF- α в сыворотке крови больных ХЛТ с гипертиреозом (табл. 1). Повышение концентрации TNF- α наряду с повышением содержания TRAIL в сыворотке крови многими исследователями рассматривается в качестве маркера некробиотических состояний. Наши данные согласуются с работой Котович [24]. Таким образом, уровень этого цитокина отражает зависимость функционального состояния ЩЖ от характера патологического процесса (апоптоз или некроз) в тироидной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование свидетельствует, что при ХЛТ имеет место TRAIL-индуцированный апоптоз. Выявление максимального повышения уровня TRAIL при ХЛТ с гипертиреозом может отражать преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами. Полученные результаты согласуются с данными многих исследователей, которые указывают на деструктивную природу гипертиреоза при ХЛТ [15, 32].

Возможно, одновременное повышение специфических и неспецифических АТ при гипертиреозе свидетельствует о высокой активности аутоиммунного процесса с преобладанием некротических процессов над апоптотическими, которые, в свою очередь, могут вызывать повреждение тиреоидных клеток и усиливать аутоиммунные реакции. Отсутствие корреляционной зависимости между всеми показателями АТ при двух других клинических проявлениях ХЛТ предполагает переход в стадию ремиссии заболевания и нормализацию процессов программированной клеточной гибели в сторону апоптоза различной степени интенсивности (например, отсутствие зависимости между АТ-ТГ и АТ-ДНК при эутиреозе). В работе Pedro и соавт. [20] также показано отсутствие корреляционной зависимости между АТ-нДНК и АТ-ТГ у больных эутиреозом. При этом активность гидролизующих АТ обнаруживает корреляционную зависимость с тяжестью клинической картины ХЛТ, а также с явлениями дисфункции и разрушения ЩЖ [33], что имело место в нашем исследовании.

Однако данный вопрос требует дальнейшего детального исследования.

Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ЛИТЕРАТУРА

- Davies T.F. (1998) J Clin Endocrinol Metab., **83**, 3391-3393.
- Morshed S.A., Latif R., Davies T.F. (2012) Immunol. Res., **54**(1-3), 191-203.
- Lorenz H.M., Herrmann M., Winkler T., Gaipl U., Kalden J.R. (2000) Apoptosis, **5**(5), 443-449.
- Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. (2000) Биохимия, **65**, 1473-1478
- Сучков С.В., Габиров А.Г., Алекберова З.С., Гнучев Н.В. (2001) Тер. архив, **10**, 58-65.
- Попов Л.С., Корочкин Л.И. (2004) Генетика, **2**, 149-166.
- Недосекова Ю.В., Уразова О.И., Кравец Е.Б., Чайковский А.В. (2009) Бюллетень сибирской медицины, **1**, 64-71.
- Саттарова Л.И., Гафиагуллина Д.Г., Аглиуллина Л.А., Винтер В.Г. (1994) Биотехнология, №11-12, 38-41.
- Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия, Москва: Изд-во Высшая школа.
- Дедов И.И. (2003) Клин. тиреолог., **1**(1), 24.
- Барановский А.Г., Матюшин А.В., Власов В.Г., Забара В.А., Наумов Р. Жьеже В.Н., Бунева Г.А. (1997) Биохимия, **62**(12), 1590-1599.
- Бубнов Н.В., Баснакьян А.Г., Вотрин И.И. (1986) Биохимия, **51**(7), 1194-1202.
- Ходарев Н.Н., Морозов А.Ю., Соколова И.А. (1988) Молек. генет. микробиол. и вирусология, **10**(9), 26-32.
- Gerke V., Moss S.E. (2002) Physiol Rev., **82**(2), 331-371.
- Volpe R. (1989) Autoimmune thyroiditis (Burrow G.N., Oppenheimer J.H., eds.), W.B. Saunders Company, Philadelphia., pp. 191-207.
- Weetman A.P. (1992) Clin Endocrinol Oxf., **36**(4), 307-323.
- Абрамова Н.А., Фадеев В.В., Герасимов Г.А., Мельниченко Г.А. (2006) Клин и экспер тиреодология, **2**(1), 21-32.
- Наумова Т.Е., Огнева Е.А., Агеев В.А., Алекберова З.С., Хитров А.Н., Габиров А.Г., Пономаренко Н.А., Сучков С.В. (2005) Клин. мед., №6, 128-133.
- Абатуров А.Е., Петренко Л.Л., Герасименко О.Н., Агафонова Е.А., Высочина И.Л., Кривуша Е.Л., Ермолаева О.А. (2009) Журн. Здоровье ребенка, **1**(16), 25-28.
- Pedro A.B., Romaldini J.H., Americo C., Takei K. (2006) Exp. Clin. Endocrinol. Diabet., **114**(1), 35-38.
- Сучков С.В., Наумова Т.Е., Третьяк Е.Б. (2004) Иммунология, **2**, 115-119.
- Kubota T. (2002) Mod. Rheumatol, **12**, 300-304.
- Nakahara M., Nagayama Y., Saitoh O., Sogawa R., Tone S., Abiru N. (2009) Endocrinology, **150**(3), 1545-1551.
- Nakkuntod J., Wongsurawat T., Charoenwong-se P., Snabboon T., Sridama V., Hirankarn N. (2006) Asian Pac. J. Allergy Immunol., **24**, 207-211.
- Космачева С.М., Гончарова Н.В., Шпак И.П. (2005) Мед. иммунол., **7**(2-3), 143-144.
- Bretz J.D., Rymaszewski M., Arscott P.L., Mys A., Ain K.B., Thompson N.W., Baker J.R. Jr. (1999) J. Biol. Chem., **274**(33), 23627-23632.
- Jeremias I., Debatin K.M. (1998) Eur. Cytokine Netw., **9**(4), 687-688.
- Котович М.М. (2003) Роль этиотропной и патогенетической терапии в клинической и морфологической эволюции хронических гепатитов у детей. Дис. д-ра мед. наук, РГМУ, Москва.
- Хараева З.Ф., Иванова М.Р., Шевченко А.А. (2011) Фундаментальные исследования, **7**, 152-154.
- Weetman A.P. (1989) Clin. Immunol. Immunopathol., **51**(2), 303-310.
- Узденский А.Б. (2010) Биол. мембраны, **27**(1), 7-17.
- Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремнинская В.М. (2007) Фундаментальная и клиническая тиреодология: Учеб. пособие, Медицина, Москва
- Андреева А.В., Сучкова Е.Н., Гаджиева С.И., Мкртумян А.М., Гришина Т.И., Сучков С.В., Ноткинс А.Л. (2011) Клиническая и экспериментальная тиреодология, **7**(2), 19-27.

Поступила: 20. 01. 2014.
Принята к печати: 12. 09. 2014.

BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL MARKERS OF AUTOIMMUNE THYROIDITIS

E.M. Biktagirova¹, L.I. Sattarova², G.R. Vagapova³, Y.V. Skibo¹, E.N. Chuhlovina¹, O.A. Kravtsova¹, Z.I. Abramova¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Basic Medicine and Biology,
18 Kremlin str., Kazan, Russia; tel.: 8(843)292-44-48; e-mail: elnarabik@gmail.com

²Interregional Clinical Diagnostic Center,

12a Karbysheva str., Kazan, Russia; tel.: 8 (843)291-10-47; e-mail: icdc@icdc.ru

³Kazan State Medical Academy, 11 Mushtari str., Kazan, Russia; tel.: 8(843)238-54-13; e-mail: ksma@mi.ru

Correlations between biochemical and immunological markers of programmed cell death (apoptosis), and the functional state of the thyroid gland (hyperthyroidism, euthyroidism, hypothyroidism) have been investigated in autoimmune thyroiditis (AT) (also known as chronic autoimmune thyroiditis). Annexin V, TRAIL and TNF- α , as well as DNA-hydrolyzing antibodies were used as the main markers. Increased levels of TRAIL were found in the serum of AT patients (hyperthyroidism>hypothyroidism>euthyroidism) compared with healthy individuals. The highest frequency of antibodies to denatured DNA (Abs-dDNA) had the highest frequency in AT patients (97%) compared with healthy controls. Among these patients, 75% had hyperthyroidism, 85% had hypothyroidism, and 84.7% had euthyroidism. Abs hydrolyzing activity demonstrated correlation dependence with symptoms of the thyroid dysfunction.

Key words: apoptosis, autoantibodies, antibodies to DNA, autoimmune thyroiditis