

УДК: 612.017.1:616.441

М.І. ШереметБуковинський державний медичний
університет, Чернівці**АПОПТОЗ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ У
ХВОРИХ НА АВТОІМУННИЙ ТИРЕОЇДИТ****Ключові слова:** автоімунний тиреоїдит, апоптоз, аннексиновий тест, CD95, фактор некрозу пухлини- α .**Резюме.** У статті наведено результати оцінки рівня апоптозу лімфоцитів крові у хворих з автоімунним тиреоїдитом (АІТ) в стадії еу-і гіпотиреозу. Проведено аналіз вмісту CD95 +, аннексин V-презентуючих (апоптозних) клітин і фактору некрозу пухлини- α в крові. Показано, що порушення програмованої загибелі лімфоцитів при автоімунному тиреоїдиті проявляється збільшенням вмісту фактору некрозу пухлини- α і CD95 + лімфоцитів на фоні зниження числа апоптозних клітин. При цьому вона найбільш виражена при АІТ у стадії еутиреоза, ніж при гіпофункції щитоподібної залози. Обговорюються можливі механізми виявлених порушень.**Вступ**

Основне місце в структурі захворювань ендокринної системи належить патології щитоподібної залози (ЩЗ). В Україні цей показник досяг 46,67% станом на 01.01.2011 р [6]. Це зумовлено з одного боку погіршенням екологічної ситуації в країні, зростанням стресових ситуацій соціогенної природи, а з іншого поліпшенням діагностики даного захворювання [3, 6, 16]. Незважаючи на те, що вивченню тиреопатій постійно приділяється належна увага провідними тиреодологами світу, ця проблема залишається досить актуальною і потребує подальшого дослідження.

У групі органоспецифічних автоімунних захворювань ЩЗ найбільш поширеним є хронічний автоімунний тиреоїдит (АІТ) [16]. Особливості перебігу захворювання полягають у можливості розвитку будь-якого виду дисфункцій: як гіпер-, так і гіпотиреозу. Загальними для всіх форм АІТ є інфільтрація щитоподібної залози лімфоцитами і плазматичними клітинами, а клінічний перебіг захворювання корелює із ступенем агресивності автоімунного запалення.

Дані літератури демонструють зростання захворюваності АІТ в Україні за останні 10 років на 68%, а в перерахунку на 100 тис. населення - на 82% [2, 6].

На теперішній час актуальним є питання механізмів, що лежать в основі порушення регуляції системи імунітету при автоімунній патології. Перспективним напрямком даного дослідження є вивчення апоптозу, який забезпечує швидке видалення пошкоджених і потенційно небезпечних для організму клітин [16]. У літературі є переконливі докази існування взаємозв'язку між порушенням регуляції процесу апоптозу і розвитком автоімунних та інших захворювань, що супроводжуються зниженням ефективності імунологічного нагляду.

© М.І. Шеремет, 2015

Дослідженнями ряду авторів показані механізми пригнічення і гіперактивації імунітету, які пов'язані з модуляцією апоптозу, в тому числі Fas - індукованою загибеллю клітин. CD95 антиген (також відомий як Fas або Apo-1) і Fas ліганд, відіграють ключову роль в апоптозі клітин імунної системи, як у функції ефektorних молекул цитотоксичних Т-лімфоцитів так і в усуненні активованих лімфоцитів шляхом пригнічення імунної відповіді [1, 2, 5].

Відомо, що доля будь-якої клітини залежить від її генетичних особливостей та факторів оточення, які на неї впливають. Генні мутації Fas / FasL супроводжуються автоімунними розладами і підвищенням рівня лімфоцитів. Негативні і рецесивні мутації в гені Fas, які перешкоджають трансдукції апоптозного сигналу, виявлені в пацієнтів з автоімунним тиреоїдитом [1,2,5].

Саме баланс позаклітинних і внутрішньоклітинних факторів визначає долю клітини. Надмірне накопичення апоптотичних клітин внаслідок порушення їх утилізації фагоцитами за участі комплементу веде до того, що власні антигени клітин розпізнаються як чужорідні, змінюючи спектр домінуючих гуморальних факторів зі збільшенням кількості протизапальних цитокінів, що володіють здатністю до тривалого підтримання імунної відповіді по Th1- шляху [10, 11].

У зв'язку з цим актуальність вивчення схильності лімфоцитів до апоптозу та вивчення механізмів модуляції стимулюючої програми клітин не викликає сумнівів. Це допоможе розкрити особливості патогенезу автоімунного тиреоїдиту і розробити патогенетично обґрунтовані підходи до оптимізації терапії цього захворювання.

Мета дослідження

Оцінити механізми апоптозу лімфоцитів пери-

ферійної крові у хворих на автоімунний тиреоїдит на основі визначення готовності клітин до апоптозу, кількості апоптотичних лімфоцитів та вмісту проапоптозного фактору некрозу пухлини- α (ФНП- α) у сироватці крові.

Матеріали та методи

У роботі наведені результати обстеження 57 пацієнтів (середній вік $40,0 \pm 12$ років), серед яких 46 жінок і 11 чоловіків, зі встановленим діагнозом хронічного автоімунного тиреоїдиту на підставі "Консенсусу з діагностики та лікування автоімунного тиреоїдиту" (2002): клінічної картини, даних фізикального обстеження, наявності характерних ультрасонографічних ознак, виявлення в сироватці хворих підвищеного титру антитиреоїдних антитіл (антитіл до тиреопероксидази та (або) тиреоглобуліну), а також при виявленні вищезазначених ознак і первинного гіпотиреозу (підвищеного рівня тиреотропного гормону (ТТГ) в поєднанні з нормальною та пониженою концентрацією вільних фракцій трийодтироніну (Т3) і тироксину (Т4).

Хворі були розділені на дві групи залежно від функціонального стану щитоподібної залози: з еутиреоїдним станом залози ($n = 27$) і з гіпотиреозом ($n = 30$). Групу здорових донорів склали 25 чоловіків та жінок віком 35-55 років. При цьому дотримувалися біоетичних принципів проведення клінічних досліджень на людині.

Матеріалом для дослідження слугувала периферійна кров, забрана з ліктьової вени вранці натщесерце в кількості 5 мл.

Виділення лімфоцитів здійснювали методом центрифугування на градієнті щільності фіколуурографіну $1,077 \text{ г/см}^3$. Визначення вмісту лімфоцитів, що несуть маркер апоптозу - CD95 + рецептор, проводилося в екстракорпоральних умовах з використанням моноклональних антитіл CD95 (Caltag, Австрія) в лімфоцитотоксичному тесті. Рівень апоптозу в популяції лімфоцитів

периферійної крові визначали шляхом встановлення екс-депресії на зовнішньому моно-шарі плазматичної мембрани молекул фосфатидилсерину методом флуоресцентної мікроскопії з використанням FITC-міченого аннексину V за допомогою набору Аннексин V FITC ("Beckman Coulter", Франція).

Для дослідження концентрації фактора некрозу пухлини ФНП- α застосовували метод проточної цитометрії і симплексні набори фірми Bender Medsystems GmbH (Австрія) з використанням технології Мультиплекс, що дозволяє в одному зразку визначати необхідну кількість цитокіну.

Статистична обробка результатів проводилася за допомогою пакета прикладних програм "Statistica 6,0". Кореляційний аналіз для вивчення взаємозв'язку досліджених ознак проводили з використанням непараметричного критерію Спірмена. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

У ході проведеного дослідження у хворих на автоімунний тиреоїдит (АІТ) в стадії еу- та гіпотиреозу виявлено достовірне збільшення середнього вмісту CD95 + лімфоцитів у периферійній крові відносно аналогічного параметра у здорових донорів, найбільш виражене при гіпофункції щитоподібної залози (табл.).

Середнє значення апоптотичної активності лімфоцитів (кількість аннексин V-презентуючих клітин) у хворих на автоімунний тиреоїдит, навпаки, було істотно нижче норми: при АІТ у фазу еутиреоза в 1,9 раза, в фазу гіпотиреозу - в 2,4 раза (табл.). Поряд з цим, у пацієнтів із автоімунним тиреоїдитом виявляли підвищення рівня TNF- α в сироватці крові порівняно з контролем.

CD95 (Fas/ APO-1 або FasR) експресується в найрізноманітніших тканинах і клітинах, включаючи лімфоцити. Підвищення числа лімфоцитів,

Таблиця

Показники апоптозу лімфоцитів периферичної крові та концентрація фактору некрозу пухлини- α в сироватці крові у здорових донорів і хворих на автоімунний

Групи дослідження		CD95+ лімфоцитів, %	Кількість annexin V+ лімфоцитів, %	Концентрація TNF α , пг/мл
Донори ($n = 25$)		$11,61 \pm 0,58$	$17,58 \pm 2,69$	$1,69 \pm 0,27$
Хворі на автоімунний тиреоїдит	Еутиреоз ($n = 27$)	$14,98 \pm 1,38$ $p < 0,05$	$10,07 \pm 2,11$ $p < 0,05$	$10,11 \pm 1,61$ $p < 0,01$
	Гіпотиреоз ($n = 30$)	$21,07 \pm 2,41$ $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$	$7,63 \pm 1,31$ $p < 0,001$	$5,14 \pm 1,79$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Примітка: p - рівень статистичної відмінності порівняно з аналогічними параметрами у здорових донорів; p₁ - рівень статистичної відмінності між групами з еутиреозом та гіпотиреозом

презентуючих CD95 є закономірним проявом активації імунної системи, що характерно для імунно-запального процесу. FasR, який, безумовно, є основним апоптогенним рецептором, необхідний як для реалізації програми рецепторного апоптозу, так і для мітогенезу клітин [1, 2, 11]. Крім того, підвищена експресія FasR клітинами робить їх доступними для цитотоксичних CD8 + лімфоцитів, що експресуються в умовах активації FasL. Встановлено, що саме Fas опосередкований шлях індукції апоптозу відіграє ключову роль у запобіганні розвитку автоімунної агресії за допомогою знешкодження налаштованих "проти свого" (автореактивних) Т-лімфоцитів і запобіганню надмірного їх накопичення в організмі [10, 11].

За результатами проведеного дослідження, збільшення рівня експресії CD95 на лімфоцитах, виявлене у хворих на АІТ із еутиреозом, було менш вираженим, ніж при гіпотиреозі. Ймовірно, це обумовлено тим, що при еутиреοїдному стані щитоподібної залози активація імунної системи відбувається в меншій мірі та компенсується захисними механізмами.

Однак, наявність на поверхні Fas-рецептора зовсім не означає обов'язкової реалізації клітиною закладеної програми загибелі. Для цього необхідно зв'язування рецептора зі специфічним лігандом, в якості якого можуть виступати FasL лімфоцитів з кілерною активністю, а також деякі цитокіни та антигени. Зв'язуючись зі своїм рецептором, CD95L (або інший подібний цитокін, антиген) запускає ланцюг передачі сигналу, що призводить до апоптозу [2, 9, 10, 11].

Ймовірно, саме через зрив зазначеного механізму, незважаючи на кількісне збільшення вмісту CD95 + лімфоцитів, при АІТ нами не було виявлено посилення апоптоза лімфоцитів. Навпаки, у хворих на АІТ при проведенні аннексинового тесту було зареєстровано достовірне зниження вмісту аннексин V-презентуючих (апоптозних) лімфоцитів, що свідчить про порушення реалізації їх рецептор-залежного апоптоза. Допустимою причиною цьому могла бути посилена продукція розчинної форми Fas-рецептора (sFas), здатної накопичуватися в мікрооточенні лімфоцитів і конкурувати з мембрано-локалізованим рецептором у зв'язуванні ліганда. Існує точка зору, що sFas пригнічує рецептор-опосередкований апоптоз і елімінацію активованих лімфоцитів, сприяє формуванню автоагресивних клонів клітин та прогресуванню автоімунного процесу [14].

Необхідно зазначити, що важлива роль у здійсненні апоптозу належить тироксину (Т4). Він регулює функціонування протеїнової тирозинкінази,

важливого елемента реалізації сигналу смерті [2, 11]. При нестачі цього гормону ЩЗ відбувається пригнічення апоптозу. Можливо, це є ще однією причиною зниження числа апоптозних клітин у пацієнтів з АІТ з гіпотиреοїдним станом щитоподібної залози.

Отримані результати дозволяють допустити кілька можливих пояснень CD95-резистентності при автоімунному тиреοїдиті. По-перше, наявність рецепторного дефекту, що (як вже обговорювалося вище) відображається в порушенні трансмембранної передачі апоптозного сигналу [6]. По-друге, наявність або відсутність клітинних і гуморальних факторів, контролюючих процес апоптозу, що виникає після активації CD95. Дане припущення може стосуватися, наприклад, експресії білків сімейства Bcl-2, яке знаходиться в зворотній кореляційній залежності із чутливістю клітин до Fas-індукованого апоптозу. При різних станах, у тому числі автоімунних, експресія даного білка може змінюватись, що послаблює процеси запрограмованої клітинної загибелі [13]. По-третє, специфічний вплив "набору" цитокінів, яким відводиться значна роль у патогенезі та розвитку автоімунної патології ЩЗ. При цьому TNF- α (важливий прозапальний цитокін), гомолог FasL, є найбільш апоптогенним із цитокінів. Сімейство TNF- α займає друге місце за значимістю в регуляції рецепторного шляху запрограмованої клітинної загибелі [4, 7, 15].

У хворих на АІТ встановлено значне збільшення концентрації TNF- α в сироватці крові, при чому більш виражене при АІТ у стані еутиреоза.

Ймовірно, це пояснюється тим, що продукція даного цитокіну пов'язана як з активністю імунних процесів, так і з рівнем тиреοїдних гормонів. Відомо, що TNF- α продукується макрофагами, а також Т-клітинами, які знаходяться в стані "спокою", але стає одним з головних чинників, що секретуються активованими Т-лімфоцитами [16]. При АІТ відбувається активація імунної системи, і підвищення рівня TNF- α є її типовим наслідком. Поряд з цим, під дією даного цитокіна відбувається пригнічення Na⁺ / K⁺ АТФ-ази, яка здійснює транспорт йодидів в тиреоцитах для синтезу тиреοїдних гормонів, що в результаті призводить до роз'єднання ефективної клітинної працездатності і пригнічення синтезу гормонів [12].

У свою чергу, трийодтиронін (Т3) сприяє збільшенню в сироватці крові рівня TNF- α [10]. Цей факт пояснює більш високий вміст цитокіна у пацієнтів в еутиреοїдним станом щитоподібної залози (при нормальному вмісті тиреοїдних гормонів в крові), ніж у пацієнтів з гіпотиреозом, при

якому відмічається зниження вмісту ТЗ. До того ж даний прозапальний цитокін підвищує цитотоксичну активність лімфоцитів, які інфільтрують ЩЗ, а також приймає участь у процесах їх апоптозопосередованої загибелі, тобто являє собою певний компонент захисної реакції макроорганізму, що контролює "силу" автоімунного процесу [3].

Вивільнення TNF- α з тиреоїдстимульованих лімфоцитів при автоімунному тиреоїдиті відіграє важливу роль у прогресуванні захворювання та розвитку кінцевої його стадії - гіпотиреозу [10,16].

Це наводить на думку про те, що при автоімунному тиреоїдиті виробляються фактори, що роз'єднують апоптичні сигнали, які генеруються TNF- α .

Передбачається, що одним із механізмів зниження чутливості клітини до індукції апоптозу, здійснюваної під дією TNF- α , може бути секреція розчинної форми рецептора TNF- α (sTNFR), яка перешкоджає зв'язуванню цитокіна зі специфічним мембранним рецептором. Потенційним патогенетичним чинником підвищення концентрації sTNFR є індукована гіперпродукцією прозапальних цитокінів (у тому числі і самим TNF- α) і, що особливо важливо, тиреоїдних гормонів інтенсифікація окисної модифікації білків і ліпідів [15].

При цьому активні метаболіти кисню, що утворюються при цьому, можуть потенціювати не тільки апоптоз-пов'язану автодеструкцію клітин (наприклад, шляхом активації Fas-залежного апоптозу), але і безпосередньо дезорганізацією мембрани клітин шеддінг ряду поверхневих (а саме TNF- α - зв'язуючих) рецепторів, що може бути причиною пригнічення TNFR1-апоптозу [10,11]. Поряд з цим, зниження рівня апоптозу лімфоцитів при АІТ може бути зумовлено властивістю TNF- α стимулювати синтез оксиду азоту NO₂, який у свою чергу здатний блокувати каспазозалежний механізм запрограмованої клітинної загибелі шляхом NF κ B - пов'язаної активації білків Bcl-2, IAP (inhibitors of apoptosis), PBK (protein B kinase) [8, 10, 11, 12, 14, 15].

Висновки

1. При одночасному зменшенні числа апоптичних (аннексин V-презентуючих) лімфоцитів в периферичній крові перебіг автоімунного тиреоїдиту супроводжується збільшенням вмісту CD95+, причому найбільш вірогідно у хворих на АІТ у стані еутиреоза, ніж при гіпофункції щитоподібної залози.

2. Збільшення концентрації фактора некрозу пухлини - α в сироватці крові у хворих на АІТ у стані еутиреоза проявляється більшою мірою, ніж

у хворих із гіпотиреозом.

3. Збільшення вмісту фактора некрозу пухлини та CD95+ лімфоцитів на фоні зниження кількості апоптозних клітин в крові при автоімунному тиреоїдиті свідчать про порушення регуляції запрограмованої загибелі лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень

Виявлення конкретних патогенетичних факторів і механізмів порушення регуляції апоптозу імунотоксичних клітин крові (лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів) і тиреоцитів при АІТ дозволить визначити причини їх виникнення і, отже, сформулювати патогенетично обґрунтовані методологічні підходи до корекції імунопатологічних змін, що становлять основу їх розвитку.

Література. 1. Недосекова Ю.В. Роль апоптоза в розвитку аутоімунних захворювань щитовидної залози / Ю.В. Недосекова, О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, А.В. Чайковский // Бюллетень сибирской медицины. - 2009. - Т.4 (2). - С. 64 - 71. 2. Олійник В.А. Хронічний лімфоцитарний тиреоїдит (тиреоїдит Хашимото): сучасний стан проблеми / В.А. Олійник // Ендокринологія. - 2006. - Т. 11 (1). - С. 71-79. 3. Рымар О.Д. Эпидемиологические исследования йодного дефицита и тиреоидной патологии в крупном центре Западной Сибири 1995-2010 гг. (на примере г. Новосибирска) / О.Д. Рымар, С.В. Мустафина, Г.И. Симонина и др. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. - 2012. - Т. 8(2). - С. 50-54. 4. Рязанцева Н.В., Роль активных форм кислорода и белков семейства Bcl-2 в реализации ФНО- α - опосредованного апоптоза лимфоцитов / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2010. - Т. 149 (2). - С. 139-142. 5. Уразова О.И. Апоптоз лимфоцитов крови у больных аутоиммунными тиреопатиями / О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, В.В. Новицкий // Медицинская Иммунология. - 2008. - Т.10(2-3). - С. 187-192. 6. Чекаліна Н. І. Сучасні уявлення про автоімунний тиреоїдит: етіологія та патогенез / Н. І. Чекаліна, Ю.М. Казаков, Є. Є. Петров // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії : Науково-практичний ж-л. - 2012. - Т. 12(4). - С. 229-232. 7. Ярилин, А.А. Апоптоз: природа феномена і його роль в нормі і при патології // Актуальні проблеми патології / Под ред. Б. Б. Мороза. - М., Медицина, - 2001. - С.13-56. 8. Andrikoula M. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease / M. Andrikoula, A. Tsatsoulis // European J. of Endocrinology. - 2001. - V. 144 (6). - P.561-568. 9. Barash J. Tumor necrosis factor (TNF) alpha and its soluble receptor (sTNFR) p75 during acute human parvovirus B19 infection in children / J. Barash, D. Dushnitski, Y. Barak [et al.] // Immunol. Lett. - 2003. - V. 88(2). - P. 109-112. 10. Giordano C. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease / C. Giordano, P. Richiusa, M. Bagnasco, G. Pizzolanti [et al.] // Thyroid. - 2001. - V.11(3). - P. 233-244. 11. Katagiri K. Regulation of apoptosis signaling-regulating kinase 1 in redox signaling / K. Katagiri, A. Matsuzawa, H. Ichijo // Methods Enzymol. - 2010. - V.474 (10). - P.277-288. 12. Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP / T. Kataoka // Crit Rev Immunol. 2005. - V.25 (1). - P. 31-58. 13. Papoff G. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro / G. Papoff, I. Cascino, A. Eramo [et al.] // J. Immunol. - 1996. - V. 156 (12). - P. 4622-4630. 14. Pekary A.E. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) inhibit the expression and activity of Na/K-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells / A.E. Pekary, S.R. Levin, D.G. Johnson [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. - 1997. - V.17 (4). - P. 185-195. 15. Fernandez V. Thyroid hormone - induced oxidative stress in rodents and humans: a comparative view

and relation to redox regulation of gene expression / V. Fernandez, G. Tapia, P. Varela, P. Romanque [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. - 2006. - V.142(3,4). - P. 231-239. 16. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease / MPJ. Vanderpump // British Medicine Bulletin. - 2011. - V. 99(1). - P. 39-51.

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ

М.И. Шеремет

Резюме. В статье приведены результаты оценки апоптоза лимфоцитов крови у больных с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) в состоянии эу- и гипотиреоза. Анализируется содержание CD95+, annexin V-презентирующих (апоптотических) клеток и фактора некроза опухоли α в крови. Показано, что нарушение программированной гибели лимфоцитов при аутоиммунном тиреоидите проявляется увеличением содержания фактора некроза опухоли α и CD95+ лимфоцитов на фоне снижения числа апоптотических клеток в крови. При этом она наиболее выражена при АИТ в состоянии эутиреоза, чем при гипофункции щитовидной железы. Обсуждаются возможные механизмы выявленных нарушений.

Ключевые слова: аутоиммунный тиреоидит, апоптоз, аннексиновый тест, CD95, фактор некроза опухоли α .

APOPTOSIS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS

M.I. Sheremet

Abstract. This article presents results of apoptosis detection among blood lymphocytes from the patients with autoimmune thyroiditis (AIT) at euthyroid and hypothyroid conditions. Contents of CD95+, annexin V-presenting (apoptotic) cells and TNF- α in blood were analyzed. It was shown, that altered regulation of programmed lymphocyte death in autoimmune thyroid disorders is demonstrated by increased content of TNF- α and CD95+ lymphocytes, being accompanied by decreased numbers of apoptotic cells in blood. Meanwhile, this pathology is expressed mostly in AIT at euthyroid condition, than in thyroid hypofunction. Possible mechanisms of the revealed disturbances are discussed.

Key words: autoimmune thyroiditis, apoptosis, annexin test, CD95, tumor necrosis factor- α .

Bukovinyna State Medical University(Chernivtsy)

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №1 (51). - P.188-192.

Надійшла до редакції 05.03.2015

Рецензент – проф. П.І. Сидорчук

© І.М. Шеремет, 2015