

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ТИРЕОПАТИЯМИ

Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В.,
Будкина Т.Е., Синюкова О.А., Недосекова Ю.В.,
Кузнецова В.Н.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию», г. Томск

Резюме. В статье приведены результаты оценки апоптоза лимфоцитов крови у больных с аутоиммунными тиреопатиями — аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) в стадии эу- и гипотиреоза и диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Анализируется содержание CD95⁺, annexin V-презентирующих (апоптотических) клеток и фактора некроза опухоли α в крови. Показано, что дисрегуляция программной гибели лимфоцитов при аутоиммунных тиреопатиях проявляется увеличением содержания фактора некроза опухоли α и CD95⁺ лимфоцитов на фоне снижения числа апоптотических клеток в крови. При этом она наиболее выражена при ДТЗ и наименее значима при АИТ в стадии эутиреоза, чем при гипотиреозе щитовидной железы. Обсуждаются возможные механизмы выявленных нарушений.

Ключевые слова: аутоиммунные тиреопатии, апоптоз, аннексиновый тест, CD95, фактор некроза опухоли α .

Urazova O.I., Kravets E.B., Novitsky V.V., Rogaleva A.V., Budkina T.E., Sinyukova O.A., Nedossekov Yu.V., Kuznetsova V.N.

APOPTOSIS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROID DISORDERS

Abstract. This article presents results of apoptosis detection among blood lymphocytes from the patients with autoimmune thyroid disorders, i.e., autoimmune thyroiditis (AIT) at euthyroid and hypothyroid stages, and in diffuse toxic goiter (DTG). 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 DTG, while being less significant in AIT at euthyroid stage, than in thyroid hypofunction. Possible mechanisms of the revealed disturbances are discussed. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 187-192)

Среди хронических неинфекционных заболеваний тиреоидная патология занимает первое место по частоте заболеваемости и территориальной распространенности. В структуре тиреоидной патологии аутоиммунным тиреопатиям также принадлежит одно из ведущих мест [2].

На сегодняшний день актуален вопрос о механизмах, лежащих в основе дисрегуляции системы иммунитета при аутоиммунной патологии.

Адрес для переписки:

Рогалева Анна Викторовна
634009, г. Томск, ул. Б. Подгорная, 40, кв. 60.
Тел.: (923) 401-16-16.
E-mail: cria_de_zorro@mail.ru

Перспективным направлением данного рода исследований является изучение апоптоза, обеспечивающего экстренное удаление поврежденных и потенциально опасных для организма клеток [13]. В литературе имеются убедительные доказательства существования взаимосвязи между нарушениями регуляции процесса апоптоза

и развитием аутоиммунных и других заболеваний, сопровождающихся снижением эффективности иммунологического надзора. Исследованиями ряда авторов показаны механизмы подавления и гиперактивации иммунитета, связанные с модуляцией апоптоза, в том числе Fas-индуцированной гибелью клеток [6].

Известно, что судьба любой клетки зависит от ее генетических особенностей и факторов окружения, которые на нее действуют. Именно баланс внеклеточных и внутриклеточных факторов определяет участь клетки. Чрезмерное накопление апоптотических клеток вследствие нарушения их утилизации фагоцитами с участием комплемента ведет к тому, что собственные антигены клеток распознаются как чужеродные, изменяется спектр доминирующих гуморальных факторов с увеличением доли противовоспалительных цитокинов, обладающих способностью к длительному поддержанию иммунного ответа по Th2-пути. В этой связи не вызывает сомнений тот факт, что изучение подверженности лимфоцитов апоптозу, механизмов модуляции тоногенной программы клеток поможет раскрыть особенности патогенеза аутоиммунного тиреоидита и диффузного токсического зоба и разработать патогенетически обоснованные подходы к оптимизации терапии этих заболеваний [7, 10].

Целью исследования явилась оценка апоптоза лимфоцитов периферической крови при аутоиммунных тиреопатиях на основе определения готовности клеток к апоптозу, количества апоптотических лимфоцитов и содержания проапоптотического фактора некроза опухоли α в сыворотке крови.

Материалы и методы

В основу данной работы положены результаты обследования 127 пациентов, мужчин и женщин, в возрасте 35–55 лет с аутоиммунными тиреопатиями. Все больные были разделены на две группы в зависимости от нозологической формы заболевания. В первую группу вошли больные аутоиммунным тиреоидитом (77 человек), которые были дополнительно разделены на две подгруппы в зависимости от функционального состояния щитовидной железы: с эутиреоидным состоянием железы ($n = 45$), с гипотиреоидным состоянием железы ($n = 32$). Во вторую группу вошли 25 больных диффузным токсическим зобом.

Группу здоровых доноров составили 25 мужчин и женщин в возрасте 35–55 лет.

Материалом для исследования служила периферическая кровь, забранная из локтевой вены утром натощак в количестве 5 мл.

Выделение лимфоцитов осуществляли методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина $1,077 \text{ г/см}^3$. Определение содержания лимфоцитов, несущих маркер апоптотической предуготовленности — CD95⁺ рецептор, проводилось в условиях *in vitro* с использованием моноклональных антител CD95 (НПО «Сорбент», Москва) в лимфоцитотоксическом тесте. Уровень апоптоза в популяции лимфоцитов перифериче-

ской крови определяли путем установления экспрессии на наружном монослое плазматической мембраны молекул фосфатидилсерина методом флуоресцентной микроскопии с использованием FITC-меченного аннексина V с помощью набора ANNEXIN V FITC («Beckman Coulter», Франция). Концентрацию фактора некроза опухоли α (TNF α) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора реагентов « α -TNF-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6,0». Для всех имеющихся выборок проверялась гипотеза нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилкса. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, а для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, — параметрический критерий Колмогорова–Смирнова. Корреляционный анализ для изучения взаимосвязи исследованных признаков проводили с использованием непараметрического критерия Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты

В ходе проведенного исследования у больных аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) в стадии эу- и гипотиреоза и диффузным токсическим зобом (ДТЗ) было выявлено достоверное увеличение среднего содержания CD95⁺ лимфоцитов в периферической крови относительно аналогичного параметра у здоровых доноров, наиболее выраженное при гиперфункции щитовидной железы (табл. 1).

Среднее значение апоптотической активности лимфоцитов (количество annexin V-презентирующих клеток) у больных аутоиммунными тиреопатиями, напротив, было существенно ниже нормы: при АИТ в фазу эутиреоза в 1,9 раза, в фазу гипотиреоза — в 2,4 раза, при ДТЗ — в 4,6 раза (табл. 1).

Наряду с этим, у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями обнаруживалось повышение уровня TNF α в сыворотке крови, также наиболее значимое при ДТЗ (в 5,6 раза сравнительно с контролем) (табл. 1).

Обсуждение

CD95 (Fas/APO-1 или FasR) экспрессируется в самых разнообразных тканях и клетках, включая лимфоциты. Повышение числа лимфоцитов, презентующих CD95, является закономерным проявлением активации иммунной систе-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ТИРЕОПАТИЯМИ, $\bar{X} \pm m$

Группы обследованных лиц		CD95 ⁺ лимфоциты, %	Количество annexin V ⁺ лимфоцитов, %	Концентрация TNF α , пг/мл
Здоровые доноры (n = 25)		11,53 \pm 0,61	17,31 \pm 2,72	1,71 \pm 0,25
Больные диффузным токсическим зобом (n = 25)		23,00 \pm 2,12 p < 0,01	3,80 \pm 0,84 p < 0,01	9,58 \pm 3,76 p < 0,01
Больные аутоиммунным тиреозом	Эутиреоидное состояние (n = 45)	15,00 \pm 1,43 p < 0,05	9,15 \pm 2,04 p < 0,05	9,05 \pm 1,58 p < 0,01
	Гипотиреозное состояние (n = 32)	20,19 \pm 2,39 p < 0,01	7,31 \pm 1,22 p < 0,05	4,96 \pm 1,84 p < 0,05

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров.

мы, что характерно для иммуновоспалительного процесса. FasR, который, безусловно, является основным апоптогенным рецептором, необходим как для реализации программы рецепторного апоптоза, так и для митогенеза клеток [8]. Кроме того, повышенная экспрессия FasR клетками делает их доступными для цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, экспрессирующих в условиях активации FasL. Установлено, что именно Fas-опосредованный путь индукции апоптоза играет ключевую роль в предотвращении развития аутоиммунной агрессии посредством уничтожения настроенных «против своего» (аутореактивных) Т-лимфоцитов и предупреждения чрезмерного их накопления в организме [4].

По результатам проведенного исследования, увеличение уровня экспрессии CD95 на лимфоцитах, обнаруженное у больных АИТ в стадии эутиреоза, было менее выраженным, чем при гипотиреозе. Вероятно, это обусловлено тем, что при эутиреоидном состоянии щитовидной железы активация иммунной системы является менее значимой, компенсируется защитными механизмами.

У пациентов с ДТЗ также было обнаружено значительное (более выраженное, чем при АИТ) повышение содержания CD95⁺ лимфоцитов. Известно, что при ДТЗ тиреоциты экспрессируют меньше FasR, чем тиреоциты при АИТ, тогда как лимфоциты, инфильтрирующие щитовидную железу, у пациентов с ДТЗ проявляют более высокий уровень экспрессии FasR, чем интра-тиреоидные лимфоциты при АИТ. Это отражает предрасположенность инфильтрирующих железу лимфоцитов к апоптозу и, возможно, ограничению их аутореактивного потенциала, ослаблению способности непосредственно повреждать ткань [10].

Однако наличие на поверхности Fas-рецептора вовсе не означает обязательной реализации клеткой заложенной программы гибели. Для этого необходимо связывание рецептора со специфическим лигандом, в качестве которого могут выступать FasL лимфоцитов с киллерной активностью, а также некоторые цитокины и антигены. Связываясь со своим рецептором, CD95L (или другой сходный цитокин, антиген) включает цепь передачи сигнала, приводящего к апоптозу [4, 15].

Вероятно, именно в виду срыва указанного механизма, несмотря на количественное увеличение содержания CD95⁺ лимфоцитов, при АИТ и ДТЗ нами не было обнаружено усиления апоптоза лимфоцитарных клеток. Напротив, у больных АИТ при проведении аннексинового теста было зарегистрировано достоверное снижение содержания annexin V-презентирующих лимфоцитов, что свидетельствует о нарушении реализации их рецептор-зависимого апоптоза. Допустимой причиной этому могла быть усиленная выработка растворимой формы Fas-рецептора (sFas), способной накапливаться в микроокружении лимфоцитов и конкурировать с мембранно-локализованным рецептором в связывании лиганда. Существует точка зрения, что sFas ингибирует рецептор-опосредованный апоптоз и элиминацию активированных лимфоцитов, способствует формированию аутоагрессивных клонов клеток и прогрессированию аутоиммунного процесса [15].

Необходимо отметить, что важная роль в осуществлении апоптоза принадлежит тироксину (Т4). Он регулирует функционирование протеиновой тирозинкиназы, важного элемента реализации сигнала смерти [9]. При недостатке этого гормона щитовидной железы происходит

подавление апоптоза. Возможно, это является еще одной причиной снижения числа апоптозных клеток у пациентов с АИТ с гипотиреодным состоянием щитовидной железы [5].

У пациентов с ДТЗ резкое снижение числа annexin-положительных лимфоцитов также свидетельствует об угнетении апоптоза, что в совокупности с установленной у больных этой группы корреляцией данного показателя с повышенным количеством предуготовленных к апоптозу CD95⁺ лимфоцитов ($r = -0,92$; $p = 0,02$) подтверждает вероятность нарушения реализации Fas-индуцированной апоптотической гибели лимфоцитов при ДТЗ [1, 12].

Полученные результаты позволяют выдвинуть несколько возможных объяснений CD95-резистентности при аутоиммунных тиреопатиях. Во-первых, наличие рецепторного дефекта, что (как уже обсуждалось выше) отражается в нарушении трансмембранной передачи апоптотического сигнала [1]. Во-вторых, наличие или отсутствие клеточных и гуморальных факторов, контролирующих процесс апоптоза, возникающий после активации CD95. Данное предположение может касаться, к примеру, экспрессии протоонкогенов семейства Bcl-2, которая находится в обратной корреляционной связи с чувствительностью клеток к Fas-индуцированному апоптозу. При различных состояниях, в том числе аутоиммунных, экспрессия данного белка может меняться, что в свою очередь лежит в основе ослабления процессов программируемой клеточной гибели [12]. В-третьих, специфическое влияние «специфического набора» цитокинов.

Цитокинам отводится значительная роль в патогенезе и развитии аутоиммунной патологии щитовидной железы. При этом TNF α (важнейший провоспалительный цитокин), гомолог FasL, является наиболее апоптогенным из цитокинов. Семейство TNF занимает второе место по значимости в регуляции рецепторного пути программированной клеточной гибели [11, 14].

У больных АИТ устанавливалось значительное увеличение концентрации TNF α в сыворотке крови, более выраженное при АИТ в стадии эутиреоза. Вероятно, это объясняется тем, что продукция данного цитокина связана как с выраженностью иммунного процесса, так и с уровнем тиреоидных гормонов. Известно, что TNF α продуцируется макрофагами и в малых количествах покоящимися Т-клетками, но становится одним из главных факторов, секретируемых активированными Т-лимфоцитами [3]. При АИТ происходит активация иммунной системы, и повышение уровня TNF α является ее типичным следствием. Наряду с этим, под действием данного цитокина происходит ингибирование Na⁺/

K⁺АТФазы, осуществляющей транспорт йодидов в тиреоциты для синтеза тиреоидных гормонов, что в результате приводит к разобщению эффективной клеточной работоспособности и ингибированию синтеза гормонов [16]. В свою очередь, трийодтиронин (Т3) способствует увеличению в сыворотке крови уровня TNF α [10]. Этот факт объясняет более высокое содержание исследуемого цитокина у пациентов с эутиреоидным состоянием щитовидной железы (при нормальном содержании тиреоидных гормонов в крови), чем у пациентов с гипотиреозом, при котором отмечается снижение содержания Т3. К тому же данный провоспалительный цитокин оказывает активирующее действие на цитотоксическую активность лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу, и участвует в процессах их апоптозопосредованной гибели, т.е. представляет собой некий компонент защитной реакции макроорганизма, контролирующей «силу» аутоиммунного процесса [2]. Высвобождение TNF α из тиреоидстимулированных лимфоцитов при аутоиммунном тиреоидите играет важную роль в прогрессировании заболевания и развитии конечной его стадии — гипотиреоза [3, 7].

Выявленное у пациентов с ДТЗ увеличение концентрации TNF α в сыворотке крови может быть связано с генетически детерминированным усилением его продукции [14]. При этом увеличение концентрации TNF α в крови закономерно предполагает индукцию апоптоза путем связывания данного цитокина со специфическим высокоаффинным рецептором TNFR1 либо в связи со стимуляцией CD95⁺ презентирующей активности клеток и индукции Fas-зависимой тонатогенной программы клеток. Однако (как уже указывалось выше) у пациентов с АИТ и ДТЗ активации апоптоза лимфоцитов не отмечалось. Это наводит на мысль о том, что при аутоиммунных тиреопатиях вырабатываются факторы, разобщающие апоптотические стимулы, генерируемые TNF α .

Предполагается, что одним из механизмов снижения чувствительности клетки к индукции апоптоза, осуществляемой под действием TNF α , может быть секреция растворимой формы рецептора TNF α (sTNFR), препятствующей связыванию цитокина со специфическим мембранным рецептором. Потенциальным патогенетическим фактором повышения концентрации sTNFR при ДТЗ является индуцированная гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (в том числе и самим TNF α) и (что особенно важно) тиреоидных гормонов интенсификация реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ). При этом активные метаболи-

ты кислорода, образующиеся в процессе ПОЛ, могут потенцировать не только апоптозсвязанную аутодеструкцию клеток (например, путем активации Fas-зависимого апоптоза), но и опосредованный дезорганизацией мембраны клеток shedding ряда поверхностных (в частности TNF α -связывающих) рецепторов, что может быть причиной угнетения TNFR1-апоптоза [7, 8]. Вероятно, это и объясняет тот факт, что при ДТЗ дисрегуляция апоптоза лимфоцитов является более выраженной, чем при АИТ.

Наряду с этим, снижение уровня апоптоза лимфоцитарных клеток при ДТЗ и других аутоиммунных тиреопатиях может быть обусловлено свойством TNF α стимулировать синтез оксида азота (NO₂), который в свою очередь способен блокировать каспаз-зависимый механизм программированной клеточной гибели путем NF- κ B-связанной активации белков bcl-2, IAP (inhibitors of apoptosis), PBK (protein B kinase) [8, 9, 10].

Выводы

1) Течение аутоиммунных тиреопатий сопровождается увеличением содержания CD95⁺ при одновременном уменьшении числа апоптотических (annexin V-презентирующих) лимфоцитов в периферической крови, наиболее выраженным у больных ДТЗ, и напротив, менее значимым при АИТ в стадии эутиреоза, нежели при гипотиреозе.

2) Увеличение концентрации фактора некроза опухоли α в сыворотке крови у больных ДТЗ проявляется в большей степени, чем у больных АИТ в стадии эу- и гипотиреоза.

3) Увеличение содержания фактора некроза опухоли α и CD95⁺ лимфоцитов на фоне снижения числа апоптотических клеток в крови при аутоиммунных тиреопатиях свидетельствуют о дисрегуляции программированной гибели лимфоцитов, более выраженной при ДТЗ, чем при АИТ.

Список литературы

1. Кайдашев И.П., Гжегорчик Я., Смравска Е., Ковальски М., ДюБаске Л. Проявление резистентности к апоптозу, индуцированному связыванием CD95(FAS) и молекул HLA I и II классов, мононуклеарными клетками периферической крови больных атопической бронхиальной астмой // Иммунология. — 2006. — Т. 26, № 1. — С. 13-18.
2. Шашкова О.А., Руденко И.Я., Пиневич А.А., Волкова А.Р., Дора С.В., Климович В.Б. Исследование аутоантител к тиреоглобулину при лечении аутоиммунного тиреоидита L-тироксинотом // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7, № 5-6. — С. 511-516.
3. Недоспасов С.А. Фактор некроза опухолей и лимфотоксин: молекулярная генетика, регуляция и физиологическая роль // Генетика. — 2003. — Т. 39, № 2. — С. 207-214.
4. Портянко А.С., Черствой Е.Д. Система Fas/FasL и ее значение для регуляции взаимоотношений опухоли и иммунной системы при папиллярном раке щитовидной железы у детей и подростков // Архив патологии. — 2003. — Т. 65, № 4. — С. 18-21.
5. Суханова Г.А., Акбашева О.Е. Апоптоз. — Томск: Изд-во ТПУ, 2006. — 172 с.
6. Фильченков А.А., Степанов Ю.М., Липкин В.М., Кушлинский Н.Е. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергология и иммунология. — 2002. — № 1. — С. 24-35.
7. Barash J., Dushnitski D., Barak Y., Miron S., Hahn T. Tumor necrosis factor (TNF) alpha and its soluble receptor (sTNFR) p75 during acute human parvovirus B19 infection in children // Immunol. Lett. — 2003. — Vol. 88, N 2. — P. 109-112.
8. Budd R. Death receptors couple both cell proliferation and apoptosis // J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 109. — P. 437-450.
9. Fernández V., Tapia G., Varela P., Romanque P., Cartier-Ugarte D., Videla L.A. Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: a comparative view and relation to redox regulation of gene expression // Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. — 2006. — Vol. 142. — P. 231-239.
10. Giordano C., Richiusa P., Bagnasco M., Pizzolanti G., Di Blasi F., Sbriglia M.S., Mattina A., Pesce G., Montagna P., Capone F., Misiano G., Scorsone A., Pugliese A., Galluzzo A. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease // Thyroid. — 2001. — Vol. 11. — P. 233-244.
11. Herbein G., O'brein W.A. Tumor necrosis factor (TNF) α and TNF receptors in viral pathogenesis // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. — 2000. — Vol. 223. — P. 241-257.
12. Iwai K., Miyawaki T., Takizawa T., Konno A., Ohta K., Yachie A., Seki H., Taniguchi N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils // Blood. — 1994. — Vol. 84. — P. 1201-1208.
13. Krammer P. CD95's deadly mission in the immune system // Nature. — 2000. — Vol. 407. — P. 789-795.
14. Nakkuntod J., Wongsurawat T., Charoenwongse P., Snabboon T., Sridama V., Hirankarn N. Association of TNF-alpha, TNF-beta, IFN-gamma

and IL-1Ra gene polymorphisms with Graves' disease in the Thai population // Asian Pac. J. Allergy Immunol. — 2006. — Vol. 24. — P. 207-211.

15. Papoff G., Cascino I., Eramo A., Starace G., Lynch D.H., Ruberti G. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro // J. Immunol. — 1996. — Vol. 156. — P. 4622-4630.

16. Pekary A.E., Levin S.R., Johnson D.G., Berg L., Hershtman J.M. 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 // J. Interferon Cytokine Res. — 1997. — Vol. 17. — P. 185-195.

поступила в редакцию 23.11.2007

отправлена на доработку 02.12.2007

принята к печати 24.12.2007