

АПОПТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ И ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЦИТОКИНЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ТИРЕОПАТИЯХ

О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, В.В. Новицкий, В.Н. Кузнецова, А.В. Рогалева

Кафедра патофизиологии (зав. — академик РАМН, профессор В.В. Новицкий)

Кафедра эндокринологии и диабетологии (зав. — профессор Е.Б. Кравец) Сибирского государственного медицинского университета, Томск

Целью исследования явилось изучение апоптоза нейтрофилов и содержания иммунорегуляторных цитокинов (TNF- α , ИЛ-8 и ИЛ-4) у больных аутоиммунным тиреоидитом и болезнью Грейвса в возрасте от 19 до 60 лет. Обследовано 52 пациента (11 мужчин и 41 женщина) с АИТ в стадии эутиреоза и 15 пациентов с болезнью Грейвса (5 мужчин и 10 женщин) и тиреотоксикозом различной тяжести. Показано, что при аутоиммунном тиреоидите и болезни Грейвса отмечается повышение “предуготовленности” нейтрофильных гранулоцитов к апоптозу на фоне выраженных изменений цитокинового профиля крови, что служит отражением активного вовлечения нейтрофилов в иммунопатогенез аутоиммунных тиреопатий.

The Apoptosis of Blood Neutrophils and Immunoregulatory Cytokines in Patients with Autoimmune Thyropaties

O.I. Urazova, E.B. Kravez, V.V. Novitskii, V.N. Kuznetsova, A.V. Rogaleva

Siberian State Medical University, Tomsk

The object of the research was to study the apoptosis of blood neutrophils and amount of immunoregulatory cytokines (TNF- α , IL-8, IL-4) in patients at the age from 19 to 60 years. 52 euthyroid patients (11 men and 41 women) with autoimmune thyroiditis (AIT) and 15 patients (5 men and 10 women) with Graves' disease (GD) with thyrotoxicosis of various severity were examined. It was shown, that current AIT and GD is characterized by an increase of neutrophils readiness for apoptosis against a background of blood cytokine profile with reflects neutrophils active involving in the disease immunopathogenesis of autoimmune thyropaties.

Введение

Тема аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) — аутоиммунных тиреопатий (АИТП) — является одной из актуальных проблем современной эндокринологии. К классическим АИТП ЩЖ относятся тиреоидит Хашимото (аутоиммунный тиреоидит — АИТ) и болезнь Грейвса (БГ). АИТ и БГ являются органоспецифическими заболеваниями ЩЖ с наследственной предрасположенностью [1, 2, 5]. Оба заболевания характеризуются лимфоидной инфильтрацией органа и наличием в сыворотке крови антитиреоидных антител. Результатом нарушения функционального состояния ЩЖ и активности тиреоидспецифического гуморального иммунитета является гибель тиреоидной паренхимы [1, 16]. Одновременно с этим формируется дисбаланс продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, который вносит значительный вклад

в иммунопатогенез АИТП и коррелирует с выраженностью аутоиммунного процесса [4, 13].

Важную роль в формировании различного рода патологических процессов, в том числе аутоиммунного генеза, играет апоптоз. Нарушения процессов инициации и реализации летальной программы клеток часто становятся основополагающими в определении характера и тяжести течения заболевания [2, 3, 7, 8]. В частности, доказана роль апоптоза в патогенезе заболеваний ЩЖ. Сама железа, а точнее, ее гормоны также могут влиять на процессы программированной гибели клеток и апоптоз-опосредованной регуляции клеточного гомеостаза [7, 14]. Между тем патогенетические факторы и механизмы дисрегуляции апоптоза в условиях реализации аутоиммунитета еще недостаточно исследованы.

Роль нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в иммунопатогенезе АИТП также остается малоизучен-

ной. НГ занимают активную позицию в системе гуморально-клеточной кооперации клеток крови и являются ключевыми инструментами инициации и определения направленности течения воспаления. Известно, что НГ способны оказывать иммунорегуляторное действие посредством секреции ряда цитокинов, избыточная продукция которых является фактором гиперактивации интратиреоидного воспалительного процесса. Показано, что вовлечение НГ в процесс деструкции ЩЖ сопровождается усилением потребления клетками кислорода и продукцией его токсичных метаболитов, что в условиях дефекта механизмов антиоксидантной защиты может служить причиной включения летальной программы тиреоидных клеток, равно как и самих полиморфно-ядерных лейкоцитов. С другой стороны, цитокины могут поддерживать жизнеспособность и предотвращать апоптоз нейтрофилов [6, 17, 18].

Учитывая тот факт, что дисрегуляции иммунитета (врожденного, адаптивного) и апоптоза являются ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунных заболеваний ЩЖ, целью данного исследования явилось изучение апоптоза НГ периферической крови и содержания иммунорегуляторных цитокинов (*tumor necrotic factor α* – TNF- α , интерлейкинов-4 (ИЛ) и 8) в сыворотке крови у пациентов с БГ и АИТ.

Материал и методы

В основу исследования положены результаты обследования 67 пациентов с АИТП в возрасте 19–60 лет (средний возраст $44,1 \pm 3,9$ года). На основании результатов клинического обследования, УЗИ и оценки функции ЩЖ (тиреотропный гормон – ТТГ, свободные фракции трийодтиронина и тироксина – св.Т₃ и св.Т₄) и содержания антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) в крови все больные были разделены на 2 группы в зависимости от нозологической формы и функциональной активности ЩЖ. В 1-ю группу были включены 52 пациента (11 мужчин и 41 женщина) с АИТ в стадии эутиреоза. Средняя продолжительность заболевания АИТ (с момента выявления) составляла $6,0 \pm 2,7$ года, средний уровень АТ-ТПО – $418,2 \pm 289,3$ МЕд/л. Во 2-ю группу вошли 15 пациентов с БГ (5 мужчин и 10 женщин) в возрасте 19–59 лет с тиреотоксикозом различной тяжести (св.Т₃ – $28,7 \pm 9,7$ нг/мл, св.Т₄ – $54,67 \pm 10,41$ нмоль/л, АТ-ТПО – $349,47 \pm 89,00$ МЕд/л). Пациенты с БГ были обследованы в начале заболевания (средняя продолжительность заболевания – 3–5 мес) до назначения тиреостатической терапии. Критериями исключения больных АИТ и БГ из исследования были наличие в анамнезе сопутствующей патологии инфекционного и неинфекционного генеза, наличие других заболеваний ЩЖ, вакцинация в течение

6 мес, предшествующих исследованию, прием иммуномодулирующих препаратов.

Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров (6 мужчин и 14 женщин) аналогичного возраста (19–60 лет) с доказанным в результате клинико-лабораторного обследования отсутствием тиреоидной патологии (ТТГ – $1,19 \pm 0,13$ мМЕд/л, св.Т₃ – $2,20 \pm 1,50$ нг/мл, св.Т₄ – $14,46 \pm 1,83$ нмоль/л, АТ-ТПО – $4,35 \pm 1,35$ МЕд/л).

Материалом исследования служили нейтрофилы и сыворотка крови. Забор крови производили из локтевой вены утром до приема пищи. Кровь стабилизировали гепарином (25 Ед/мл). Выделение НГ из цельной крови осуществляли на градиенте плотности Ficoll-Paque 1,093 г/см³ (Pharmacia, Швеция) [9, 10]. Процентное определение количества CD95⁺-клеток осуществляли методом непрямой поверхностной иммунофлуоресценции с использованием наборов фирмы “МедБиоСпектр” (г. Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

Содержание TNF- α , ИЛ-4 и ИЛ-8 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов “ α -ФНО-ИФА-БЕСТ”, “ИЛ-4-ИФА-БЕСТ”, “ИЛ-8-ИФА-БЕСТ” (“Вектор-Бест”, г. Новосибирск, Россия) согласно рекомендациям производителя. Оптическую плотность растворов регистрировали на микропланшетном фотометре Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием программы Statistica for Windows 6.0. Обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Для проверки гипотезы нормальности распределения выборочных данных использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Нейтрофильные гранулоциты, как уже указывалось выше, принимают активное участие в формировании аутоиммунного воспаления. Реакция нейтрофила, направленная на локализацию и элиминацию антигена, зависит во многом от силы и времени антигенного воздействия на иммунную систему и исходного уровня функциональной активности клеток.

Структурно-метаболический статус полиморфно-ядерных гранулоцитов неразрывно связан с выполнением их профессиональных задач и складывается из активации, адгезии, хемотаксиса клеток,

Таблица 1. Содержание CD95⁺-нейтрофилов и цитокинов в периферической крови у здоровых доноров и у больных с аутоиммунными тиреопатиями, $\bar{X} \pm m$

Группы обследованных лиц	CD95 ⁺ -нейтрофилы, %	ФНО-α, пг/мл	ИЛ-4, пг/мл	ИЛ-8, пг/мл
Здоровые доноры (n = 20)	18,50 ± 1,21	1,34 ± 0,25	2,47 ± 0,17	2,82 ± 0,08
Больные БГ (n = 15)	35,33 ± 1,48 $p_1 < 0,01^*$	6,62 ± 1,11 $p_1 < 0,01^*$	18,14 ± 1,45 $p_1 < 0,001^*$	70,47 ± 1,23 $p_1 < 0,001^*$
Больные АИТ (n = 52)	29,85 ± 1,53 $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,05^{**}$	10,84 ± 0,49 $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,05^{**}$	21,96 ± 1,11 $p_1 < 0,001^*$	56,57 ± 1,28 $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,01^{**}$

* p_1 - уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

** p_2 - уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у больных БГ.

поглощения флогогена, его киллинга и расщепления. При этом цитокины могут модулировать функции НГ прямо или опосредованно через лимфоциты, моноциты и другие активированные клетки [12, 17]. Роль цитокинов в регуляции функционального статуса нейтрофилов биполярна. С одной стороны, они выступают в качестве факторов, вызывающих активацию НГ, что чревато дальнейшим истощением функциональных возможностей клеток. В связи с этим гиперактивированные нейтрофилы могут сами регулировать степень своей чувствительности к цитокинам, осуществляя шеддинг (слушивание) и/или интернализацию (обращение внутрь клетки) цитокиновых рецепторов. С другой стороны, цитокины поддерживают жизнеспособность и предотвращают апоптоз нейтрофилов, что характерно для ИЛ-1β, интерферона-γ (ИНФ), грануломоноцитарного и гранулоцитарного колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ, Г-КСФ). Другая группа цитокинов, к примеру ИЛ-2, TNF-α, способна, напротив, индуцировать апоптоз [15, 19, 20].

Как известно, Fas-антиген (CD95) является мембранным клеточным рецептором, индуцирующим апоптоз лейкоцитов и клеток ряда других линий при контакте с соответствующим лигандом (Fas-L). Таким образом, уровень экспрессии CD95 отражает степень готовности клетки к апоптотическому стимулу [14, 15]. По результатам проведенного нами исследования количество CD95-рецепторнесущих НГ у больных АИТ в среднем составляло $29,85 \pm 1,53\%$ при гиперфункции ЩЖ (БГ) — $35,33 \pm 1,48\%$, что было достоверно выше, чем у здоровых доноров ($p_1 < 0,01$ и $p_2 < 0,001$ соответственно) (табл. 1). Это позволяет утверждать, что у больных АИТП отмечается повышенная предрасположенность НГ к апоптозу, что, на наш взгляд, может быть проявлением защитной реакции, направленной на устранение “излишка” активных нейтрофилов, формирование которого усиливает повреждение тканей. Кроме этого, ввиду того, что при взаимодействии Fas-R с Fas-L (уровень экспрессии которого по данным литерату-

ры при АИТП многократно увеличивается) “предупрежденность” лейкоцитов к апоптозу реализуется в гибель клетки, увеличение количества CD95⁺-НГ при АИТП вполне обоснованно можно расценивать в качестве косвенного признака активации программированной гибели клеток [9, 12, 15].

Согласно современным представлениям TNF-α относится к числу наиболее апоптогенных цитокинов [6]. Известна, в частности, его способность индуцировать Fas-опосредованный апоптоз CD95⁺-клеток при взаимодействии мембранного Fas-рецептора и Fas-лиганда (Fas-L) [14]. К рецепторам TNF-α-опосредованной клеточной гибели относятся также рецепторы TNF-R1 и R2. При этом рецепция TNF-α генерирует два типа сигналов: первый — инициирует апоптоз, второй — наоборот, блокирует. Апоптотический эффект TNF-α зависит от соотношения данных сигналов. Причина такого рода двойственности эффекта кроется в том, что активируются разные молекулы, опосредующие каскад гибели клетки. Апоптоз, индуцированный связыванием TNF-α с TNF-R1, может осуществляться через путь “FADD-каспаза 8”, а также сходный с ним адапторный белок TRADD (TNF-R — *associated death domain protein*). В то же время интересно, что гиперэкспрессия TRADD ведет не только к запуску процессов апоптоза, но и к активации ядерного фактора κB (NFκB), который предотвращает TNF-индуцированную гибель клетки путем индукции синтеза ингибиторного фактора (FLIP) [4, 8, 9, 15].

Результаты проведенного нами исследования показали, что у больных АИТП, независимо от формы заболевания, концентрация TNF-α в сыворотке крови была выше контрольных значений показателя (в группе больных БГ практически в 5 раз, $p_1 < 0,01$; при АИТ — в 8 раз, $p_1 < 0,001$ относительно нормы) (см. табл. 1). Кроме того, у больных АИТ концентрация TNF-α в крови была более высокой, нежели у пациентов с БГ (см. табл. 1).

Известно, что нарушение контролируемой продукции TNF-α может приводить к гипертрофии фи-

зиологической функции гранулоцитов, что способствует деструкции собственных тканей организма. Показано усиление синтеза TNF- α пропорционально активности патологического процесса. Реакция нейтрофилов на TNF- α проявляется стимулированием экспрессии молекул адгезии на поверхности НГ и эндотелиальных клеток (что увеличивает тропность данных клеток друг к другу), хемотаксиса (путем индукции синтеза ИЛ-8 и других хемотоксинов), фагоцитоза, цитотоксических и цитолитических свойств НГ, обусловленных секрецией миелопероксидазы, лизоцима, пероксида водорода, гипохлорита, оксида азота. С индукцией апоптоза НГ связывают противовоспалительный эффект TNF- α [11, 14]. Именно этим, на наш взгляд, может быть обусловлено более низкое содержание CD95⁺-нейтрофилов у больных АИТ по сравнению с таковым при БГ при обратном соотношении концентрации TNF- α в сыворотке крови. (У больных АИТ она было достоверно выше, чем у больных БГ; $p_2 < 0,05$). (См. табл. 1).

Апоптоз играет важную роль в элиминации НГ из воспаленной ткани без выброса внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство, контролирует длительность и интенсивность воспалительного ответа и степень опосредованного нейтрофилами повреждения тканей, является механизмом, поддерживающим надлежащее количество НГ в организме [7, 9, 12]. Предполагается, что TNF- α индуцирует апоптоз только при определенных условиях и только определенных фракций НГ. Воздействуя на нейтрофилы человека, TNF- α способен индуцировать два пути клеточной гибели: “классический” каспазозависимый апоптоз и “неклассическую” каспазозависимую смерть клетки [14, 15, 21]. Таким образом, представленные данные позволяют рассматривать повышение содержания TNF- α в крови у больных АИТП в качестве фактора модуляции численности НГ и критерия оценки активности аутоиммунного воспаления, что, совершенно очевидно, зависит от степени увеличения концентрации цитокина, которая может быть либо “полезной”, либо “вредной” для организма.

Другим важным фактором регуляции функций нейтрофилов является ИЛ-8 [12]. В результате проведенных исследований было установлено, что концентрация ИЛ-8 в крови у больных АИТП достоверно превышала значение соответствующего показателя у здоровых доноров ($2,82 \pm 0,08$ пг/мл). Концентрация цитокина в сыворотке крови у больных БГ составляла $70,47 \pm 1,23$ пг/мл, а у больных АИТ — $56,58 \pm 1,28$ пг/мл, что было соответственно в 25 и 20 раз выше нормы ($p_1 < 0,001$). При этом уровень ИЛ-8 в крови при БГ значительно превышал анало-

гичный показатель у больных АИТ ($p_2 < 0,01$) (см. табл. 1).

Известно, что ИЛ-8 увеличивает в 10 раз экспрессию на поверхности нейтрофилов адгезивных молекул семейства $\beta 2$ -интегринов, главным образом CD11b/CD18, и повышает в 200 раз их аффинитет к связываемым лигандам (ICAM-1,2), усиливает адгезивность НГ, их хемотаксис и облегчает тем самым миграцию клеток в очаг повреждения. Связывание ИЛ-8 с его рецепторами, обильно представленными на нейтрофилах, приводит к активации сократительного аппарата клетки, образованию цитоплазматических ламелл и экзоцитозу гранул, содержащих лизосомальные ферменты. Имеются также данные о способности ИЛ-8 угнетать адгезию НГ к монослою активированных липополисахаридом эндотелиальных клеток, что сопряжено с shedding L-селектинов. Кроме того, ИЛ-8 увеличивает связывание нейтрофилов с эритроцитами, покрытыми липидом А, потенцирует аттракцию фагоцитов к бактериям, стимулирует бактерицидность нейтрофилов, респираторный взрыв, синтез лейкотриенов. Однако перечисленные эффекты менее выражены, чем активация хемотаксиса и дегрануляции клеток [12, 19, 20, 22].

Поскольку при БГ содержание ИЛ-8 в сыворотке крови было выше, чем при АИТ, это позволяет думать о том, что активность нейтрофилов и уровень восприятия ими разного рода (в том числе апоптотических) стимулов у данной категории больных также могли быть более выраженными, чем, вероятно, и объясняется тот факт, что степень “предуготовленности” НГ к апоптозу (количество CD95⁺-клеток) при БГ превышала таковую при АИТ (см. табл. 1).

Наряду с увеличением концентрации ИЛ-8 у пациентов с БГ и АИТ повышенной оказалась также концентрация ИЛ-4 в сыворотке крови. Средний уровень ИЛ-4 в крови в группе контроля был равен $2,47 \pm 0,17$ пг/мл, в то время как у больных БГ он был в 7,3 раза ($18,14 \pm 1,45$ пг/мл; $p_1 < 0,001$), а при АИТ почти в 9 раз ($21,96 \pm 1,11$ пг/мл, $p_1 < 0,001$) выше нормы (см. табл. 1).

В трудах отечественных и зарубежных исследователей документирована способность ИЛ-4 усиливать опосредованный Th-2-клетками гуморальный иммунный ответ, синтез и секрецию IgG активированными В-лимфоцитами, подавлять освобождение цитокинов воспаления (TNF- α , ИЛ-1, ИЛ-8) [7, 8, 23]. Показано, в частности, что ИЛ-4, равно как и ИЛ-10, может оказывать противовоспалительное действие путем депрессии транскрипции генов и усиления деградации мРНК-цитокинов воспаления. В этой связи увеличение концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови у больных АИТП также может расце-

ниваться как фактор контроля активности клеточно- и цитокино-посредованного аутоиммунного повреждения ЩЖ и функциональной активности НГ как основных эффекторов воспаления.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно сделать вывод о том, что при АИТП отмечается повышение “предуготовленности” НГ к апоптозу на фоне выраженных изменений цитокинового профиля крови, что служит отражением активного вовлечения нейтрофилов в иммунопатогенез заболевания. Увеличение содержания концентрации TNF- α , ИЛ-8 и ИЛ-4 в сыворотке крови у больных БГ и АИТ может служить фактором модуляции апоптотической и функциональной активности НГ и активности аутоиммунного процесса в целом.

Список литературы

1. Акинчев А.А. Аутоиммунный тиреоидит: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Л., 1996. 22 с.
2. Болотская Л.А., Маркова Т.П. Клинико-иммунологическая характеристика больных аутоиммунным тиреоидитом // Иммунология. 2002. № 3. С. 175–177.
3. Виноградова Ю.Е., Шинкаркина А.П., Поверенный А.М. Аутоиммунный тиреоидит при заболеваниях системы крови // Терапевтический архив. 2003. Т. 75, № 12. С. 83–92.
4. Глазнова Т.В., Бубнова Л.Н., Трунин Е.М. и др. Продукция некоторых цитокинов у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. 2004. Т. 50, № 3. С. 29–32.
5. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология: учебник. М.: Медицина, 2000. 632 с.
6. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз // Екатеринбург: УроРАН, 2001. 277 с.
7. Калинин А.П., Потемкина Е.Е., Пешева Н.В. и др. Иммунологические аспекты аутоиммунного тиреоидита // Проблемы эндокринологии. 1994. Т. 40, № 1. С. 56–58.
8. Кандрор В.И. Молекулярно-генетические аспекты тиреоидной патологии // Проблемы эндокринологии. 2001. Т. 47, № 5. С. 3–10.
9. Кандрор В.И. Современные проблемы тиреоидологии // Проблемы эндокринологии. 1999. № 1. С. 3–8.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.
11. Новиков А.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979. 216 с.
12. Пауков В.С., Кауфман О.Я. Структурно-функциональная характеристика нейтрофильных гранулоцитов и их роль в формировании воспалительных и иммунных процессов // Архив патологии. 1983. Т. 45, № 5. С. 3–13.
13. Петунина Н.А. Клиника, диагностика и лечение аутоиммунного тиреоидита // Проблемы эндокринологии. 2002. Т. 48, № 6. С. 16–22.
14. Потанин М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237–242.
15. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. 2002. Т. 1, № 3. С. 27–33.
16. Старкова Н.Т. Руководство по клинической эндокринологии. 3-е изд. СПб.: Питер, 2002. 576 с.
17. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, 2000. 231 с.
18. Цыган В.В. Актуальные проблемы иммунологии. СПб.: Гуманистика, 2004. 44 с.
19. Чумакова С.П. Реактивность нейтрофильных гранулоцитов при операциях в условиях искусственного кровообращения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2006. 24 с.
20. Aijjan R.A., Weetman A.P. Cytokines in thyroid autoimmunity // Autoimmunity. 2003. V. 36. P. 351–359.
21. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases // Intern. Med. 2001. V. 40. P. 275–84.
22. Volpe R. Autoimmune thyroid disease – a perspective // Molec. Biol. Med. 1986. V. 3. N 1. P. 25–51.
23. Volpe R. The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review // Curr. Pharmaceut. Desing. 2001. V. 7. P. 451–460.