

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИТОПНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.В. Зубков, В.В. Свиридов, Г.А. Кириллова, Н.Ф. Гаврилова, Г.И. Кузнецова, И.В. Яковлева, Е.В. Шамкина, Н.С. Кузьмина

ГОУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

А.В. Зубков — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний; В.В. Свиридов — канд. мед. наук, заведующий лабораторией клеточных гибридов; Г.А. Кириллова — научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний; Н.Ф. Гаврилова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов; Г.И. Кузнецова — научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний; И.В. Яковлева — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов; Е.В. Шамкина — лаборант-исследователь лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний

Проблема гетерогенности эпитопов анти тиреопероксидазных аутоантител человека, выявляемых при болезни Грейвса и аутоиммунном тиреоидите, изучалась с использованием моноклональных антител к тиреоидной пероксидазе. Показано, что в конкуренции за центры связывания тиреоидной пероксидазы с аутоантителами из сыворотки крови пациентов с болезнью Грейвса и аутоиммунным тиреоидитом участвуют 8 моноклональных антител к эпитопам 1, 70, 82, 88, 2, 3, 77 и 79. Максимальное подавление связывания отмечено для аутоантител, направленных к конформационному эпитопу 3, при болезни Грейвса — $60,3 \pm 12,7\%$, при аутоиммунном тиреоидите — $61,8 \pm 32,2\%$. Причем степень подавления связывания не зависела от концентрации антител к тиреоидной пероксидазе в сыворотке крови пациентов с болезнью Грейвса в отличие от образцов сыворотки больных с аутоиммунным тиреоидитом. Аутоантитела в сыворотке больных аутоиммунным тиреоидитом подавляли связывание моноклональных антител к эпитопу 77 значительно сильнее, чем в сыворотке пациентов с болезнью Грейвса, — $36,3 \pm 17,2$ и $54,3 \pm 9,6\%$ соответственно ($p \leq 0,05$). Полученные результаты свидетельствовали о специфичности аутоантител к определенным участкам молекулы тиреоидной пероксидазы и согласовывались с данными литературы. Можно предположить, что дальнейшее изучение конкурентных взаимодействий с аутоантителами других моноклональных антител, не включенных в проведенное исследование, а также расширение панели сывороток крови больных с различными формами патологии щитовидной железы, позволит выявить новые иммунодоминантные участки на молекуле тиреоидной пероксидазы, ответственные за формирование аутоантител при различных заболеваниях, и будет способствовать улучшению диагностики, контроля за состоянием функции щитовидной железы и проводимым лечением.

Ключевые слова: аутоантитела, пероксидаза щитовидной железы, эпитопы, моноклональные антитела, аутоиммунный тиреоидит, гипотиреоз, болезнь Грейвса.

Evaluation of epitopes specificity of antibodies to thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disorders

A.V. Subkov, V.V. Sviridov, G.A. Kirillova, N.F. Gavrilova, G.I. Kusnezova, E.V. Jakovleva, E.V. Shamkina, N.S. Kuzmina

Mechnikov's Scientific Institute for Vaccines and Serums, Moscow

The problem of the human antithyroid peroxidase autoantibodies epitopes heterogeneity diagnosed in case of Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis has been researched using monoclonal antibodies to thyroid peroxidase. It was shown, that in the competition for the binding sites of thyroid peroxidase and autoantibodies taken from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis sera participate 8 mAb to epitopes 1, 70, 82, 88, 2, 3, 77 and 79. The maxima of the binding inhibition has been marked for the conformation epitope mAb 3: in case of Graves' disease it amounts to $60.3 \pm 12.7\%$, in case of Hashimoto's thyroiditis — $61.8 \pm 32.2\%$. Moreover the level of the binding inhibition did not depend on the concentration of Ab to thyroid peroxidase in the sera of patient with

Graves' as opposed to the serum of patients with Hashimoto's thyroiditis. Autoantibodies in the serum of the patients with Hashimoto's thyroiditis inhibited the binding of mAb to epitope 77 much more effectively, than in the serum of the patients with: 36.3 ± 17.2 and $54.3 \pm 9.6\%$ ($p \leq 0.05$).

The obtained results represented the specific reaction of the autoantibodies to the certain thyroid peroxidase molecular patterns which corresponds to the literature data. It is possible to assume that the further research of the competitive interactions with other autoantibodies to monoclonal antibodies, not included in this trial, and widening of the different thyroid diseased patients' serum palette can expose new immunodominant thyroid peroxidase molecular patterns, forming antibodies for different diseases, and enable the development of diagnostics and control of the thyroid functions and applied therapy.

Key words: autoantibodies, thyroid peroxidase, epitopes, monoclonal antibodies, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease.

Введение

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) — наиболее актуальные проблемы современной эндокринологии. Болезнь Грейвса (БГ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ) являются самыми частыми причинами нарушения функции щитовидной железы (ЩЖ), при этом распространенность перечисленных выше заболеваний продолжает увеличиваться [1–4].

Основными антигенами ЩЖ, имеющими значение в развитии АИЗ, являются тиреоглобулин (ТГ), тиреопероксидаза (ТПО) и рецептор тиреотропного гормона (рТТГ). Современные исследования сосредоточены на выявлении эпитопов молекул аутоантигенов (ТГ, ТПО, рТТГ), с которыми взаимодействуют тиреоидспецифические Т-клетки и тиреоидные аутоантитела. Имеющиеся данные убедительно свидетельствуют о том, что у разных лиц эти эпитопы неодинаковы [5–11].

В настоящее время ТПО рассматривается как ведущий аутоантиген [12–16]. Антитела (АТ) к ТПО выявляются в 90–100% случаев в сыворотке больных с АИЗ ЩЖ, в 20–35% — с узловым зобом, в 60–70% — с гипотиреозом. Отмечена корреляция между титром антител к ТПО и гистологическими изменениями ЩЖ при АИТ [17, 18]. Эти антитела в отличие от АТ-ТГ и рТТГ способны фиксировать комплемент и таким образом участвовать в лизисе тиреоцитов. При этом антимикросомальные АТ по своей цитотоксичности гетерогенны. Только часть исследованных сывороток крови больных с АИТ Хашимото обладала способностью лизировать тиреоциты в присутствии комплемента [19]. С помощью химерных белков выявлено трехкратное превышение количества аутоантител к фрагменту ТПО, сформированному

513–633 аминокислотными основаниями, в сыворотке крови пациентов с АИТ ($n = 45$) по сравнению с сывороткой больных с БГ ($n = 48$) [20]. Методом проточной цитофлуорометрии на культуре тиреоцитов было показано, что аутоантитела в образцах сыворотки крови больных с БГ ($n = 15$) к эпитопу МкАТ 64 [21] выявляются на 45% чаще, чем у больных с многоузловым эутиреоидным зобом ($n = 15$) [22]. Выяснение причин подобной гетерогенности аутоантител у больных с различными нарушениями функции ЩЖ может уточнить патофизиологические механизмы развития АИЗ ЩЖ. Одним из способов решения этой проблемы является использование моноклональных антител (МкАТ) и генно-инженерных пептидов [13, 23, 24]. На основе сравнительного анализа специфичности МкАТ и выявляемых в сыворотке с АИЗ ЩЖ аутоантител возможно определение тонкой эпитопной направленности аутоантител при различных формах патологии ЩЖ. В связи с этим целью работы являлось изучение эпитопной направленности аутоантител к ТПО при различных заболеваниях ЩЖ с использованием ранее полученной коллекции моноклональных антител к ТПО [25–27].

Материал и методы

В работе использовали 10 МкАТ к ТПО, из которых 5 реагировали с нативной ТПО, а пять с денатурированной (табл. 1). Эпитопную специфичность изучали методом конкурентного ИФА: в лунки планшета одновременно вносили МкАТ и МкАТ-ПХ (МкАТ, конъюгированные с пероксидазой хрена), в концентрации соответствующей 50% связыванию АТ с антигеном, иммобилизованным на планшете [25–27]. В качестве контроля использовали лунки с МкАТ-ПХ. Оп-

Таблица 1. Моноклональные антитела (МкАТ) к тиреоидной пероксидазе (ТПО)

Антиген	Количество МкАТ	Титр МкАТ в супернатантах	Титр МкАТ в асцитах
Нативная ТПО	5 : 2, 3, 55, 77, 79	10^2 – 10^3	10^5 – 10^7
Денатурированная ТПО	5 : 1, 70, 76, 82, 88	10^2 – 10^3	10^3 – 10^6

Таблица 2. Образцы сыворотки крови

Группы	Диагноз	Общее число образцов сыворотки	Концентрация АТ к ТПО, МЕ/мл (количество образцов сыворотки)
1-я	БГ 80–200 (n = 5) 200–500 (n = 4)	13	Менее 50 (n = 2)
2-я	Гипотиреоз в исходе АИТ 200–500 (n = 4) Более 500–1000 (n = 6) Более 1000 (n = 2)	16	Менее 15 (n = 4)
3-я	Практически здоровые	20	Менее 50

титескую плотность проб, не содержащих антител, принимали за 100%, ингибирование связывания на 60% и более считали полным, на 30–59% – частичным, менее чем на 30% – недостоверным. Степень связывания МкАТ-ПХ позволяла определить специфичность используемой пары АТ.

Образцы сыворотки крови больных были получены из ФГУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ (Москва) (табл. 2). 1-ю и 2-ю группы составили пациенты с клинически подтвержденным диагнозом “болезнь Грейвса” и гипотиреозом в исходе АИТ соответственно. В 3-ю группу были включены практически здоровые лица без патологии ЩЖ.

АТ-ТПО в сыворотке крови человека определяли методом ИФА [27, 28]. В качестве твердой фазы использовали планшеты, сенсibilизированные ТПО человека в концентрации 5,0–7,5 мкг/мл. АТ выявляли конъюгатом моноклональных антител к IgG человека, меченных пероксидазой из корня хрена в рабочем разведении. Калибровочные пробы готовили на основе сывороток крови человека и оценивали по международному стандарту АТ-МФТ № 66/387. Чувствительность метода составляла 10 МЕ/мл, диапазон определяемых концентраций 25–1000 МЕ/мл. Уровень АТ-ТПО в сыворотке крови доноров не превышал 50 МЕ/мл.

Эпитопную специфичность аутоантител изучали методом конкурентного ИФА. В лунки планшета, сенсibilизированного ТПО в концентрации 1,0 мкг/мл, предварительно вносили МкАТ в разведении, соответствующем 50% связыванию с ТПО; в контрольные лунки – 0,01 М ФСБТ. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре 37° С. В. После проведения этапа отмывки в лунки добавляли образцы сывороток крови пациентов с АИЗ ЩЖ. Планшет выдерживали 1 ч при 37° С, отмывали и добавляли конъюгированные с пероксидазой из корня хрена мышинные МкАТ к IgG человека в рабочем разведении и инкубировали 1 ч при 37° С. Реакцию проявляли субстратно-хромогенной смесью (ТМБ). Снижение связывания аутоантител с сорбентом (ТПО) в лунках с предварительно внесенными МкАТ по

сравнению с контрольными позволяло выявить общую эпитопную направленность аутоантител и данных моноклональных АТ. Значимым считали подавление связывания 15% и более. Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Данные в тексте и таблицах представлены в виде $M \pm SD$ (M – средняя арифметическая, SD – среднее квадратичное отклонение).

Результаты и их обсуждение

По данным конкурентного ИФА 10 моноклональных АТ взаимодействовали с пятью иммуногенными участками ТПО: с доменом 1, в состав которого входили эпитопы трех МкАТ – 1, 70, 88; доменом 2 – 2, 82; доменом 3 – 55, 77, 79; доменом 4 – 3 и доменом 5 – 76 (рис. 1). МкАТ 1 и 70 направлены к од-

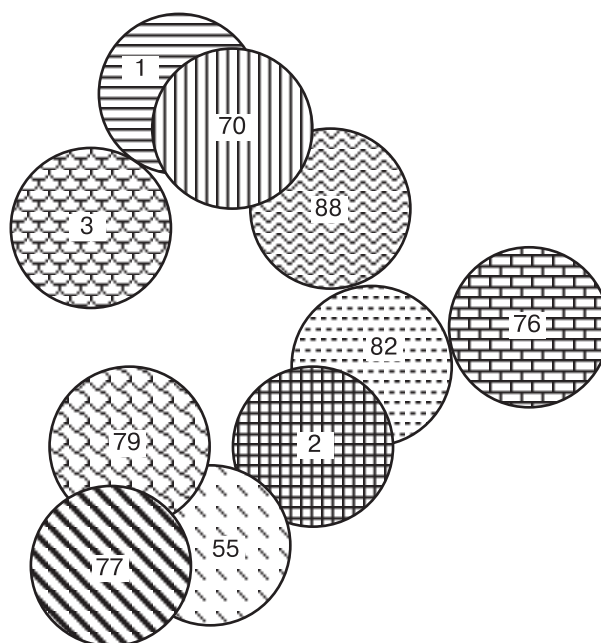


Рис. 1. Распределение эпитопов ТПО, распознаваемых МкАТ. Домен 1 образован участками молекулы ТПО, распознаваемыми АТ 1, 70 и 88; домен 2 – 2 и 82; домен 3 – 55, 77 и 79; домены 4 и 5 распознаются АТ МкАТ 3 и МкАТ 76 соответственно.

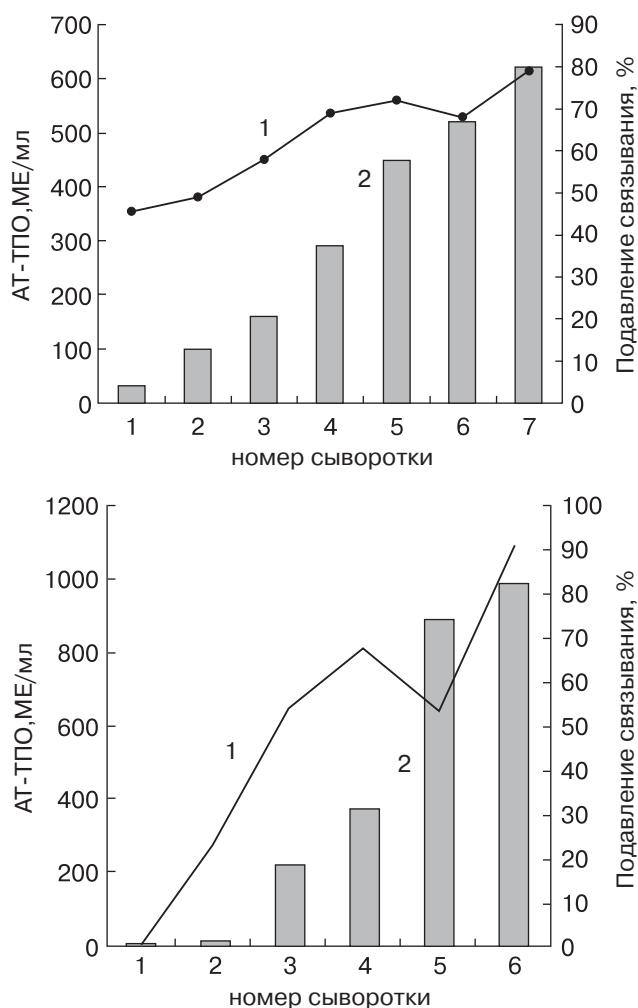


Рис. 2. а — специфичность аутоантител сыворотки крови больных ДТЗ к эпитопу 3 молекулы ТПО (по данным конкурентного ИФА с МкАТ 3). 1 — кривая изменения степени подавления связывания в зависимости от концентрации АТ-ТПО; 2 — уровень АТ-ТПО в сыворотке, МЕ/мл;

б — специфичность аутоантител сыворотки крови больных гипотиреозом к эпитопу 3 молекулы ТПО (по данным конкурентного ИФА с МкАТ 3). 1 — кривая изменения степени подавления связывания в зависимости от концентрации АТ-ТПО; 2 — уровень АТ-ТПО в сыворотке, МЕ/мл.

ной или двум близкорасположенным антигенным детерминантам на молекуле ТПО. Полученные данные об эпитопной структуре ТПО позволили подойти к изучению проблемы гетерогенности эпитопов анти тиреопероксидазных аутоантител человека, выявляемых при различной тиреоидной патологии.

При изучении эпитопной специфичности аутоантител больных с различными заболеваниями ЩЖ (БГ (n = 13), АИТ (n = 16)) было показано, что в конкуренции за центры связывания ТПО с аутоантителами из сыворотки крови больных БГ и АИТ участвуют 8 МкАТ к эпитопам 1, 70, 82, 88, 2, 3, 77 и 79. Максимальное подавление связывания отмечено для аутоантител, направленных к конформационному эпитопу 3, при БГ — $60,3 \pm 12,7\%$, при АИТ — $61,8 \pm 32,2\%$. Причем степень подавления связывания не зависела от концентрации АТ-ТПО в сыворотке крови больных БГ (рис. 2, а) в отличие от образцов сыворотки больных с АИТ (рис. 2, б). На рис. 2 (а, б) проиллюстрированы результаты экспериментов на примере 7 образцов сыворотки больных БГ и 14 — АИТ.

Как видно из данных табл. 3, аутоантитела сыворотки больных АИТ подавляли связывание МкАТ к эпитопу 77 значительно сильнее, чем сыворотки больных БГ — $36,3 \pm 17,2$ и $54,3 \pm 9,6\%$ соответственно ($p < 0,5$). В сыворотке больных АИТ степень подавления их связывания не зависела от общего уровня антител к ТПО в широком диапазоне концентраций (3,0 — более 10 000 МЕ/мл) (рис. 3). В сыворотке больных с БГ отмечено усиление торможения связывания МкАТ 77 при высоком уровне АТ к ТПО (более 500 МЕ/мл).

Полученные результаты свидетельствовали о специфичности аутоантител к определенным участкам молекулы ТПО и согласовывались с данными литературы о преимущественной направленности аутоантител к конформационным эпитопам молекулы ТПО [13, 14, 29, 30]. Однако нами было показано, что линейные эпитопы 1, 70, 82 и 88 также являлись иммунодоминантными. МкАТ подавляли связывание аутоантител к указанным эпитопам на 32–51%.

Таблица 3. Перекрестная реактивность аутоантител с МкАТ*

Исследованные образцы	Процент подавления связывания МкАТ аутоантителами (M $\pm$ SD)							
	номер МкАТ							
	линейные эпитопы				конформационные эпитопы			
	1	70	82	88	2	3	77	79
БГ (n = 13)	$32,0 \pm 5,6$	$43,2 \pm 9,9$	$43,0 \pm 9,8$	$50,8 \pm 15,0$	$43,2 \pm 14,7$	$60,3 \pm 12,7$	$36,3 \pm 17,2$	$49,8 \pm 12,6$
АИТ (n = 16)	$42,1 \pm 16,9$	$36,1 \pm 20,1$	$45,2 \pm 17,1$	$43,8 \pm 15,0$	$43,2 \pm 19,6$	$61,8 \pm 32,2$	$54,3 \pm 9,6$	$57,8 \pm 19,1$

Примечание. *Процесс подавления связывания МкАТ аутоантителами сыворотки крови доноров не превышал 15%.

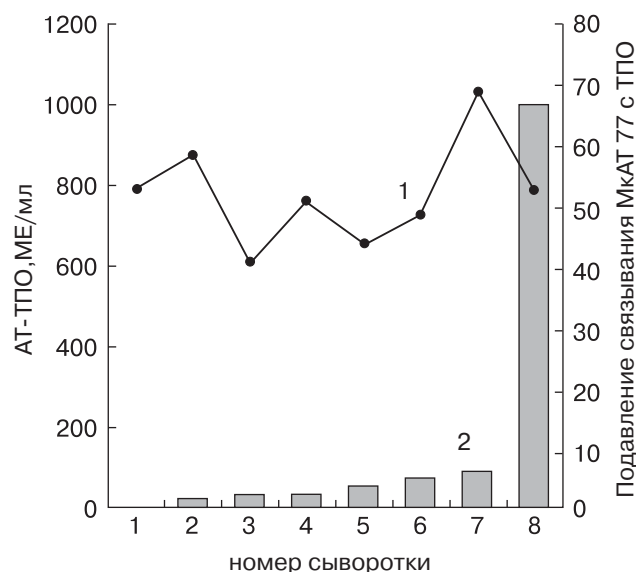


Рис. 3. Специфичность аутоантител сыворотки крови больных гипотиреозом к эпитопу 77 молекулы ТПО (по данным конкурентного ИФА с МкАТ 77): 1 — кривая изменения степени подавления связывания, в зависимости от концентрации АТ-ТПО; ряд 2 — уровень АТ-ТПО в сыворотке, МЕ/мл.

Таким образом, картирование эпитопов ТПО с помощью МкАТ-ТПО позволило подойти к изучению проблемы гетерогенности специфичности анти-ТПО аутоантител человека, выявляемых при различных заболеваниях ЩЖ. Следует полагать, что оценка конкурентных взаимодействий с аутоантителами других МкАТ, не включенных в проведенное исследование, а также расширение панели сывороток крови больных с различными формами патологии ЩЖ позволит выявить иммунодоминантные эпитопы аутоантигенов, определяющие специфичность аутоантител при разных формах патологии ЩЖ, и подойти к дифференциальной диагностике АИЗ ЩЖ.

Список литературы

1. Мельниченко Г.А. Аутоиммунный тиреозит: клинические рекомендации российской ассоциации эндокринологов / Мат. 2-го Рос. тиреоидол. конгр. "Актуальные проблемы заболеваний щитовидной железы", 20–21 ноября М., 2002. С. 5–18.
2. Мельниченко Г.А. Проблемы классификации и клинической диагностики узлового зоба / Мат. 2-го Рос. тиреоидол. конгр. "Актуальные проблемы заболеваний щитовидной железы", 20–21 ноября 2002 г. М., С. 43–49.
3. Шилин Д.Е. Актуальные вопросы лабораторной диагностики заболеваний щитовидной железы (современные рекомендации международных организаций) // Лаборатория. 2002. №3. С. 22–25.
4. Трошина Е.А. К вопросу о недостатке и избытке йода в организме человека // Клин. экпер. тиреидол. 2010. Т. 6. №4. С. 9–16.
5. Weetman A.P. The potential immunological role of the thyroid cell in autoimmune thyroid disease // Thyroid. 1994. V. 4(4). P. 493–499.
6. Weetman A.P., Black C.M., Cohen S.B. et al. Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid autoantibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis // Scand. J. Immunol. 1989. V. 30. P. 73–82.
7. Weetman A.P. The role of T lymphocytes in thyroid-associated ophthalmopathy // Autoimmun. 1992. V. 13(1). P. 69–73.
8. Weetman A.P., Fung H.Y.M., Richards C.J., McGregor A.M. IgG subclass distribution and relative functional affinity of thyroid microsomal antibodies in postpartum thyroiditis // Eur. J. Clin. Invest. 1990. V. 20. P. 133–136.
9. Tandon N., Freeman M., Weetman A.P. T cell responses to synthetic thyroid peroxidase peptides in autoimmune thyroid disease // Clin. Exp. Immunol. 1991. V. 86. P. 56–60.
10. Tandon N., Yan S.L., Morgan B.P., Weetman A.P. Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease // Immunol. 1994. V. 81. P. 643–647.
11. Nagayama Y., Seto P., Rapoport B. Characterization, by molecular cloning, of smaller forms of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid in human thyroid cells as alternatively spliced transcripts // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990. V. 71(2). P. 384–390.
12. Portolano S., McLachlan S.M., Rapoport B. High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies. // J. Immunol. 1993. V. 151(5). P. 2839–2851.
13. Portolano S., Chazenbalk G.D., Seto P. et al. Recognition by recombinant autoimmune thyroid disease-derived Fab fragments of a dominant conformational epitope on human thyroid peroxidase // J. Clin. Invest. 1992. V. 90(3). P. 720–726.
14. Volpe R. B-lymphocytes in autoimmune thyroid diseases (AITD) // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2000. V. 1 (1–2). P. 79–86.
15. Ruf J., Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. 2006. V. 445. P. 269–277.
16. Ludgate M., Costagliola S., Vassart G. Animal models of Graves' disease. In Graves' disease: pathogenesis and treatment / Ed. B. Rapoport, S.M. McLachlan. Massachusetts: Kluwer Acad. Publish. Norwell, 2000. P. 127–138.
17. Jeong H.J., Lee M.K., Choi I.J., Lee Y.B. Distribution of lymphocytic subpopulations infiltrated in thyroid glands of Graves disease // Yonsei Med. J. 1989. V. 30(2). P. 118–124.
18. Paschke R., Vogg M., Swillens S., Usadel K.H. Correlation of microsomal antibodies with the intensity of the intrathyroidal autoimmune process in Graves' disease // J. Clin. Endocr. Metab. 1993. V. 77 (4). P. 939–943.
19. Кандрор В.И., Крюкова И.О., Крайнова С.И. Антитиреоидные антитела и аутоиммунные заболевания // Пробл. эндокринологии. 1997. Т. 43. №3. С. 28–30.
20. Bermann M., Magee M., Koenig R.G. et al. Differential autoantibody responses to thyroid peroxidase in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993. V. 77 (4). P. 1098–1101.
21. Ruf J., Toubert M.E., Czarnocka B. et al. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase // Endocr. 1989. V. 125. P. 1211–1218.

22. Bossowski A., Stasiak-Barmuta A., Czarnocka B. et al. Applikation of mouse monoclonal antibodies for identifications of antigen regions of human thyroid peroxidase in adolescents with Graves disease and non-toxic multinodular goiter by flow cytometry // *Autoimmun.* 2005. V 38 (8). P. 605–611.
23. Ruf J., Czarnocka B., De Micco C., Duttoit C., Ferrand M., Carayon P. Thyroid peroxidase is the organ-specific “microsomal” autoantigen involved in thyroid autoimmunity. // *Acta Endocr. Suppl. (Copenh).* 1987. V 281. P. 49–56.
24. Banga J.P., Mirakian R., Hammond L. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed towards the microsomal/microvillar thyroid autoantigen recognized by Hashimoto autoantibodies // *Clin. Exp. Immunol.* 1986. V. 64 (30). P. 544–554.
25. Кузьмина Н.С., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела к человеческой пероксидазе щитовидной железы // *Биотехнология.* 2005. №1. С. 51–57.
26. Зубков А.В., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела в исследовании структуры тиреопероксидазы – ведущего аутоантигена щитовидной железы // *Физиология и патология иммунной системы.* 2005. Т 9. №8. С. 25–30.
27. Зубков А.В. Изучение эпитопной структуры пероксидазы щитовидной железы человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2006.
28. Кузьмина Н.С., Кузнецова Г.И., Яковлева И.В. и др. Разработка иммуноферментного количественного метода определения антител к пероксидазе щитовидной железы // *Аллергия, астма и клиническая иммунология.* 1999. №9. С. 145–147.