

ДИСБАЛАНС СИСТЕМЫ “ЛИГАНД–РЕЦЕПТОР” ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α И ЭКСПРЕССИЯ TNF-RI В ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА

*Саприна Т.В.¹, Прохоренко Т.С.², Мартынова С.Ю.¹,
Дзюман А.Н.³, Зима А.П.², Попов О.С.⁴, Хлусов И.А.⁵,
Латыпова В.Н.¹, Рязанцева Н.В.²*

ГБОУ ВПО “Сибирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения России:

¹ кафедра эндокринологии и диабетологии,

² кафедра молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики,

³ НОЦ морфологических исследований,

⁴ кафедра общей хирургии,

⁵ НОЦ “Биосовместимые материалы и биоинженерия” при НИ ТПУ, СибГМУ и ИФПМ СО РАН

Саприна Т.В. — канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВПО СибГМУ; Прохоренко Т.В. — ассистент кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ; Мартынова С.Ю. — врач-эндокринолог клиники эндокринологии ГБОУ ВПО СибГМУ; Дзюман А.Н. — канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, НОЦ “Инновационные технологии в морфологии” ГБОУ ВПО СибГМУ; Зима А.П. — доктор мед. наук, профессор кафедры фундаментальных основ клинической медицины ГБОУ ВПО СибГМУ; Попов О.С. — доктор мед. наук, профессор, зав. клиникой общей хирургии ГБОУ ВПО СибГМУ, профессор кафедры общей хирургии; Хлусов И.А. — доктор мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии, проректор по учебной работе НОЦ “Инновационные технологии в морфологии” ГБОУ ВПО СибГМУ; Латыпова В.Н. — канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВПО СибГМУ; Рязанцева Н.В. — доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ, проректор по стратегическому развитию, инновационной политике и науке НОЦ “Биосовместимые материалы и биоинженерия” при НИ ТПУ, СибГМУ и ИФПМ СО РАН.

Целью исследования явилось изучение состояния системы “лиганд–рецептор” фактора некроза опухолей α (TNF- α) в зависимости от функционально-морфологических исходов болезни Грейвса (БГ). Было показано, что активация системы TNF- α наблюдается на фоне “мягкого” и “доброкачественного” клинического течения БГ и сочетается с появлением морфологических маркеров аутоиммунного тиреоидита (онкоцитарная трансформация тиреоидного эпителия).

Ключевые слова: болезнь Грейвса, аутоиммунные тиреопатии, TNF- α , TNF-RI, sTNF-RI.

Imbalance of the "ligand-receptor" tumor necrosis factor α system and TNF-RI expression in thyroid tissue in patients with Graves' disease

*Saprina T.V.¹, Prokhorenko T.S.², Martynova S.Y.¹,
Dzyuman A.N.³, Zima A.P.², Popov O.S.⁴, Khlusov I.A.⁵,
Latipova V.N.¹, Ryazantseva N.V.²*

*State Educational Institution of Higher Professional Education “Siberian State Medical University”
Health Ministry of the Russian Federation:*

¹ Endocrinology and Diabetology Department

² Molecular Medicine and Clinical Laboratory diagnostics Department

³ Scientific Educational Center of innovative technologies in the morphology

⁴ General Surgery Department

*⁵ Scientific Educational Center “Biocompatible materials and bioengineering” at the Federal Research
Tomsk Polytechnic University*

The aim of the study was to examine the system of tumor necrosis factor α (TNF- α), depending on the functional and morphological outcome of Graves' disease (GD). It has been shown that activation of TNF- α is associated with a “soft” and “benign” clinical course of GD and appearance of morphological markers of autoimmune thyroiditis (Hurthle-cells transformation of thyroid epithelium).

Key words: Graves' disease, an autoimmune tireopatii, TNF- α , TNF-RI, sTNF-RI.

Введение

подавляющее большинство исследований, посвященных изучению иммунопатогенеза органоспецифических аутоиммунных заболеваний, имеют существенное ограничение, связанное с методическими трудностями оценки иммунологических реакций в самом органе-мишени. Так, огромное количество экспериментальных данных, накопленных в отношении аутоиммунного сахарного диабета, но касающихся изменений системного иммунитета, не может подвести исследователей к разработке эффективных иммуоинтервенционных технологий, поскольку результаты, полученные на экспериментальных животных, не находят своего подтверждения в клинических испытаниях. Достаточно сложно, иногда невыполнимо, организовать исследование таким образом, чтобы проследить всю цепочку иммунологических реакций со стороны системного иммунитета и одновременно в вовлеченном органе, учитывая трудность прижизненного морфологического исследования, например, островкового аппарата поджелудочной железы. Тем не менее при изучении патологии щитовидной железы (ЩЖ) в ряде случаев можно исследовать то, что происходит непосредственно в органе-мишени, и провести некоторые клинко-иммунологические и морфологические параллели, раскрыв тем самым некоторые закономерности и особенности органоспецифического аутоиммунного воспаления.

Ключевую роль в иммунопатогенезе аутоиммунных тиреопатий (АИТП) играют цитокины [1]. К их числу относится и фактор некроза опухолей альфа (tumour necrosis factor α (TNF- α)). В физиологических условиях TNF- α проявляет себя как иммунорегулятор, участвует в процессах пролиферации и дифференцировки различных типов клеток, влияет на апоптоз клеток и стимулирует выработку различных цитокинов [2, 3, 4]. Проведение сигнала от TNF- α в клетки-мишени осуществляется через рецепторы (TNF-R), которые представлены как мембраносвязанными, так и растворимыми формами (sTNF-R). Результаты исследований свидетельствуют о важной роли взаимодействий рецепторов TNF- α со специфическими лигандами в регуляции функционирования иммунокомпетентных клеток и фолликулярного эпителия ЩЖ [5, 6]. Целесообразность более подроб-

ного рассмотрения вопросов участия системы TNF- α в патогенезе АИТП обусловлена необходимостью понимания причин различного клинического течения отдельных их вариантов, а следовательно, и разработки теоретических подходов к новым терапевтическим стратегиям.

Цель настоящего исследования — оценка состояния системы “лиганд–рецептор” TNF- α при болезни Грейвса (БГ) в зависимости от клинко-морфологического исхода заболевания.

Материалы и методы

В группу пациентов с БГ было включено 45 пациентов (14 мужчин и 31 женщина) в возрасте 18–55 лет (47,0 [35,0–53,0] лет), удовлетворяющих следующим критериям: верифицированный диагноз БГ, проживание в Томской области и г. Томске не менее 10 лет, согласие пациента на исследование.

Диагноз в каждом конкретном случае верифицировался согласно общепринятым критериям по следующему алгоритму: наличие характерных жалоб и анамнеза, выявление признаков заболевания при клиническом осмотре (в том числе пальпаторная характеристика ЩЖ, установление степени тяжести тиреотоксикоза), анализ медицинской документации, оценка ультрасонографических данных ЩЖ и гормонального профиля.

Материалом для данных исследований являлась сыворотка крови, для получения которой венозную кровь, взятую из локтевой вены утром до приема пищи, помещали в вакуумные пробирки “BD Vacutainer” с активатором свертывания кремнеземом (Becton Dickinson, США), центрифугировали пробирки 5 мин при 400 g (1500 об/мин). В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ), свободных фракций T_4 и T_3 (“Вектор-Бест”, Россия), антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) и к рецептору тиреотропного гормона (АТ-рТТГ) (DRG, Германия).

Контрольная группа включала 30 человек, средний возраст — $45,3 \pm 5,6$ лет, и была сопоставима по полу и возрасту с группами пациентов с БГ, не страдавших аутоиммунными заболеваниями, с учетом аналогичных критериев исключения из программы исследования.

Исследовали стабилизированную гепарином (25 Ед/мл) венозную кровь, взятую утром до приема пищи. Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования с использованием Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37°C и $5\% \text{ CO}_2$ в питательной среде (90% RPMI-1640 (ЗАО “Вектор-Бест”, Россия), 10% инактивированной при 56°C эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”, Россия)). Секрецию мононуклеарными лейкоцитами TNF- α и sTNF- α -RI оценивали в супернатантах клеточных культур с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкциям фирм-производителей тест-систем (ЗАО “Вектор-Бест” (Россия), BenderMedSystems (Австрия) соответственно).

Количество клеток крови, несущих мембраносвязанный рецептор фактора некроза опухолей первого типа (TNF-RI), оценивали методом проточной лазерной цитометрии на цитометре Epics XL (Beckman Coulter, США) с использованием меченых моноклональных антител (МКАТ) к TNF-RI (CD20 α). После культивирования клетки отмывали фосфатным буфером (pH 7,2) и окрашивали стандартными МКАТ к TNF-RI, меченными FITC (Immunotech, Франция), в объеме 10 мкл. Анализ проводили на основе определения малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, и бокового светорассеяния (SSC), свидетельствующего о цитоплазматических, а также мембранных особенностях клетки. Наряду с этим анализировали параметры зеленой (FITC – 530 нм) флюоресценции на FL1-канале.

Исследование секреции цитокинов *in vitro* и количества несущих комплементарные рецепторы лимфоцитов проводилось у пациентов с БГ до оперативного лечения. В основной группе 19 пациентам по различным показаниям (отсутствие ремиссии БГ на фоне тиреостатической терапии в течение 1,5 лет, диффузно-узловой токсический зоб) проведено оперативное лечение в объеме субтотальной и тотальной тиреоидэктомии. Были исследованы гистологические препараты операционного материала из ткани ЩЖ у пациентов с БГ. Фиксировали материал в 10% забуференном (pH = 7,4) растворе формалина, дегидратировали в IsoPrep (Biovitrum, Россия), затем заливали в парафин Histomix (Biovitrum, Россия). На микротоме Accu-Cut®SRM™200b (Sakura, Япония) изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм и переносили на предметные стекла с L-полилизинным покрытием (Menzel, Германия).

Обзорную микроскопию осуществляли на микропрепаратах, окрашенных по стандартной методике

гематоксилином Гарриса (Biovitrum, Россия) и эозином (Biovitrum, Россия).

Иммуногистохимическое исследование операционного материала ЩЖ осуществляли по методике Ю.А. Криволапова [7]. Фиксировали материал и переносили на предметные стекла аналогичным образом (как описано выше).

Депарафинизированные срезы проводили по трем порциям этанола (96°), промывали 5 мин в дистиллированной воде, помещали стекла со срезами в пластиковый держатель и погружали в 0,01 М цитратный буфер pH = 6,0, после чего осуществляли высокотемпературную демаскировку антигенов в микроволновой печи (МВП).

Демаскировку проводили в два этапа: при мощности P = 600 Вт – в течение 1 мин, после остывания при открытой дверце – 7 мин при мощности P = 400 Вт (выходная мощность МВП – 800 Вт). После демаскировки оставляли емкость со стеклами остывать при комнатной температуре на 20 мин и промывали в двух порциях фосфатного буфера по 5 мин, наносили блокирующий эндогенную пероксидазу реагент (Peroxidase Blocking Reagent, Thermo Scientific, США) на 5 мин, после промывали в дистиллированной воде 5 мин и в фосфатном буфере также 5 мин. Затем наносили на 5 мин блокирующую сыворотку (blocking serum, NovoCastrа, Великобритания) и промывали в 2 сменах фосфатного буфера по 5 мин. Далее наносили первичные антитела (TNF-RI, клон 7C11, NovoCastrа, в разведении 1 : 100) и инкубировали срезы при температуре 25°C 60 мин. Первичные антитела предварительно разводили UltraAb Diluent Plus (Thermo Scientific, США).

После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере и наносили на срезы вторичные биотинилированные антитела на 30 мин, промывали в буфере и наносили стрептавидин-пероксидазный комплекс также на 30 мин, затем промывали в фосфатном буфере. Для выявления продуктов иммунной реакции на срезы наносили раствор диаминобензидина (DAB, NovoCastrа, Великобритания) на 5 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, проводили через этанол и ксилол и заключали в канадский бальзам.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Leica (Германия) под увеличением $\times 150$, $\times 200$, $\times 400$. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Для оценки специфичности параллельно ставили реакцию без добавления первичных антител – “негативный” контроль окрашивания.

Анализ полученных результатов проводили с помощью программы SPSS v.11.5. Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Шапиро–Вилка. Результаты представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартилей [Q_1 – Q_3]. Достоверность различий в частоте встречаемости качественных признаков в двух группах анализировалась с помощью критерия χ^2 . Корреляционный анализ проводился с помощью критерия Спирмена (r). Для оценки достоверности различий показателей в сравниваемых группах использовали критерии Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Исследование соответствовало требованиям локального этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Минздрава Российской Федерации от 19.06.2003 № 266. Все лица, участвующие в исследовании, подписали информированное согласие.

Результаты

При оценке гистологического строения ткани ЩЖ при БГ учитывали, что при данном заболевании выделяют 3 гистологических варианта [8, 9].

Первый (классический) вариант – пролиферативные явления со стороны тиреоидного эпителия, который образует сосочкообразные выросты в просвет фолликулов, отчего последние принимают звездчатый вид (рис. 1, а).

Второй вариант – гиперплазия тиреоидного эпителия в виде появления мелких фолликулов с низким цилиндрическим эпителием с резорбцией коллоида или с полным его отсутствием, без признаков лимфоидной инфильтрации (рис. 1, б).

Третий вариант – с усиленной пролиферацией тиреоидного эпителия (“сандерсеновские подушечки” или сосочкообразные выросты), эпителий кубический, лимфоидная инфильтрация сочетается с трансформацией тиреоидного эпителия в клетки Ашкенази (рис. 1, в).

В нашем исследовании у пациентов наиболее часто встречался 2-й гистологический вариант (50% случаев, $n = 9$), классический – в 25% случаев ($n = 5$), 3-й – в 9% ($n = 2$) случаев. В 16% случаев ($n = 3$) у пациентов с БГ наблюдалось сочетание 2-го и 3-го гистологических вариантов. Больных с 3-м гистологическим вариантом строения ЩЖ и сочетанием 3-го и 2-го вариантов объединили в одну

группу ($n = 5$) ввиду отсутствия достоверных межгрупповых отличий в значениях изучаемых показателей ($p > 0,05$).

При сопоставлении клинко-инструментальных данных отмечено преобладание классического варианта с формированием “псевдососочков” и “подушек Сандерсена” у пациентов с БГ с большим объемом зоба. Так, медиана объема ЩЖ у пациентов с 1-м гистологическим вариантом составила 55,3 [42–64] мл, со 2-м вариантом – 32,0 [18,3–36,9] мл, с 3-м и смешанным (2-й и 3-й) вариантами регистрировались самые низкие показатели объема ЩЖ – 24,0 [14,2–28,3] мл ($p < 0,05$). Таким образом, можно предположить, что пролиферативные процессы в ЩЖ при БГ имеют прогрессивный тип течения, т.е. начинаются с экстрафолликулярного типа пролиферации, при усилении пролиферативных сигналов появляется интрафолликулярный тип пролиферации. Согласно другой интерпретации результатов, мы сталкиваемся с различными механизмами перестройки ткани вследствие воздействия различных по механизму иммунологических реакций в ЩЖ при АИТП, и при БГ в частности.

Однонаправленные результаты были получены также при анализе гормональных показателей. Уровень ТТГ оказался минимальным у пациентов с 1-м (классическим) вариантом гистологического строения ЩЖ: 0,01 [0,01–0,01] мМЕ/л в сравнении с 0,02 [0,01–0,04] мМЕ/л ($p = 0,02$) при 2-м варианте и 0,05 [0,03–0,06] при 3-м варианте. Таким образом, становится очевидным, что степень пролиферативных процессов связана с выраженностью гипертиреоза при БГ.

Интересен также тот факт, что уровень специфических для БГ аутоантител (АТ-рТТГ) при классическом гистологическом варианте был выше (49,8 [34,6–57,5] мМЕ/мл), чем при 2-м (33,7 [24,2–38,4] мМЕ/мл) и 3-м (17,9 [8,0–20,0] мМЕ/мл) гистологических вариантах, а уровень АТ-ТПО, наоборот, возрастал от 1-го к 3-му варианту: у пациентов с 1-м типом составлял 397,4 [31,9–762,0] МЕ/л, со 2-м – 541,7 [273,3–806,5] МЕ/л и с 3-м – 990,1 [824,2–1156,0] МЕ/л соответственно.

Данный факт подтверждает предположение, что при клиническом диагнозе БГ не исключено сочетание двух аутоиммунных заболеваний – аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и БГ одновременно. При этом в ткани железы происходит сочетание иммунологических процессов, проявляющихся в морфофункциональных реакциях ткани, которые подчас носят полярный, взаимно уравнивающий характер: при меньшей выраженности АИТ происходит более выраженная базедофикация ткани, проявляющаяся значительной экстра- и интрафолликулярной гипер-

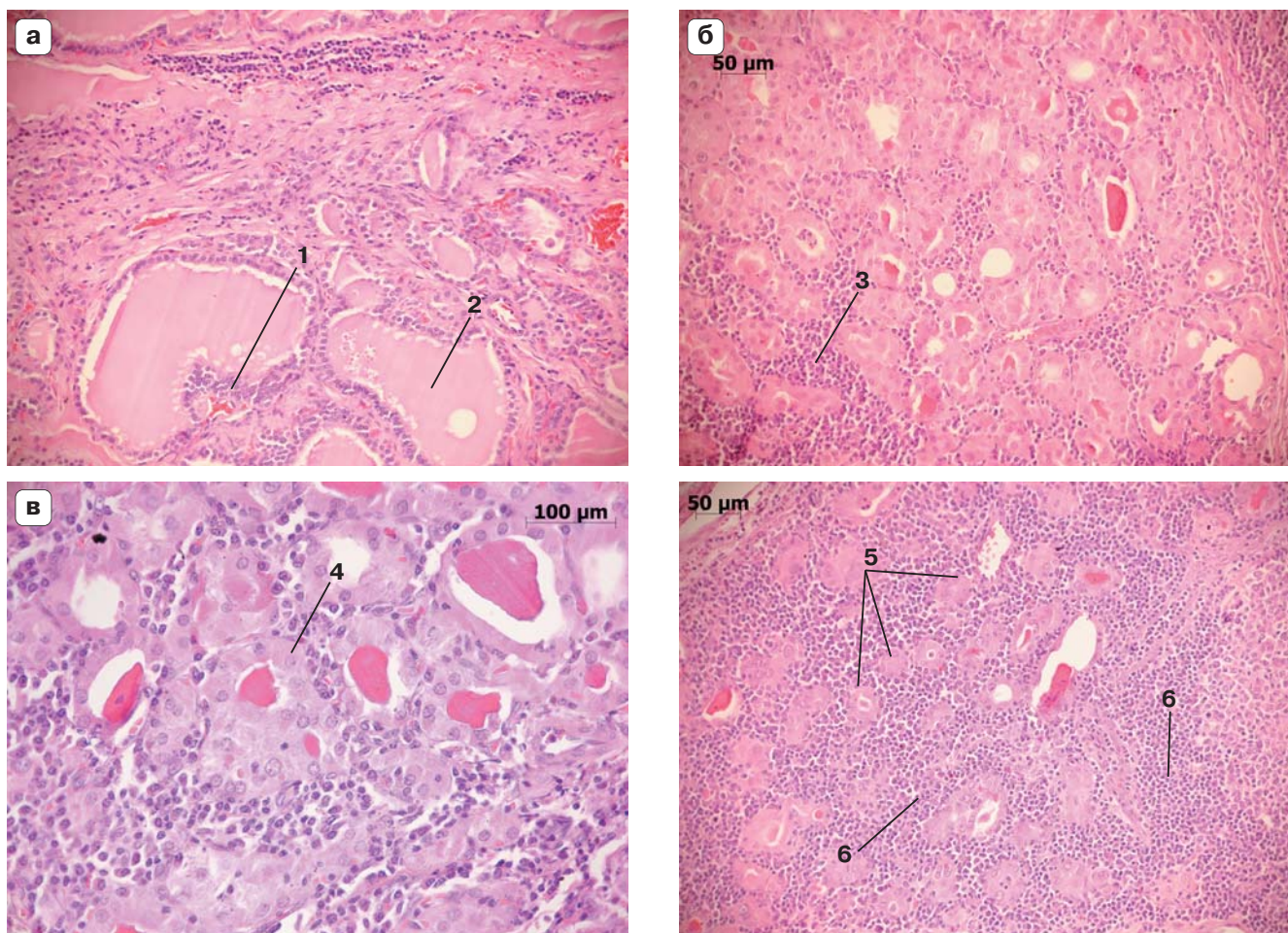


Рис. 1. Различные варианты гиперпластических процессов при болезни Грейвса.

а — интрафолликулярный тип гиперплазии; 1 — пролиферация интрафолликулярного эпителия, образование многослойных “подушек Сандерсена”, складки, симулирующие сосочки; 2 — коллоид жидкий, бледно окрашивающийся или совсем неокрашенный, пенистый по краям, резорбция коллоида. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$.

б — экстрафолликулярный тип; 3 — пролиферация экстрафолликулярного эпителия, увеличение количества и объема островков тиреоцитов, между фолликулами среди клеток происходит накопление коллоида, формирование мелких фолликулов, затем более крупных. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$.

в — экстрафолликулярный тип с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия. Слева: 4 — фолликулы с клетками Ашкенази (круглые клетки с эозинофильной зернистой цитоплазмой и большим ядром) на фоне экстрафолликулярной гиперплазии эпителия у пациента с БГ. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$. Справа: 5 — мелкие фолликулы, тиреоидный эпителий фолликулов представлен преимущественно клетками Ашкенази—Портле (онкоциты), на фоне выраженной лимфоплазмочитарной инфильтрации (6) практически отсутствует коллоид (пациент с БГ, гипертиреоз I). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

плазией фолликулярного эпителия, увеличением объема ЩЖ и выраженным синдромом гипертиреоза; при большей выраженности АИТ, наоборот, отмечается только экстрафолликулярный тип гиперплазии, менее выраженные зобогенез и тяжесть гипертиреоза.

Данные клинко-морфологические параллели подтверждают давние наблюдения клиницистов о том, что сочетание АИТ и БГ более благоприятно в плане тяжести проявлений и возможности стойкой медикаментозной и спонтанной ремиссии АИТ.

В то же время было отмечено, что медиана возраста пациентов с БГ с различными гистологически-

ми вариантами значительно различается. Пациенты с БГ и классическим для БГ гистологическим вариантом перестройки паренхимы практически в 2 раза моложе (26 [24–36] лет, $p < 0,05$), чем пациенты со 2-м и 3-м гистологическими вариантами БГ — 49 [37–53] и 53 [46–55] лет соответственно. Данная клиническая особенность согласуется с известным фактом преобладания “чистых” классических вариантов БГ среди лиц молодого возраста и накоплением заболеваемости АИТ с исходом в стойкий гипотиреоз с возрастом. Поэтому данные клинко-морфологические параллели могут быть крайне полезными для даль-

нейшего изучения специфических механизмов БГ и АИТ и разработки панели клинических, иммунологических и морфологических предикторов исхода данных патологий.

Медиана стажа заболевания у пациентов с 1-м гистологическим вариантом БГ составила 2 года [0,8–2,5 года], со вторым – 4 года [0,5–8,0 лет] и с 3-м – также 4 года [2,2–6,5 лет], что также косвенно отражает тяжесть заболевания и выраженность синдрома тиреотоксикоза. Это явилось показанием для радикального хирургического лечения АИТ. Современные клинические рекомендации указывают на необходимость радикального излечения БГ (оперативное лечение или радиойодтерапия) после 1,5–2 лет тиреостатической терапии, если стойкая ремиссия заболевания не была достигнута. Поэтому обращает на себя внимание столь большой стаж БГ (максимально 10 лет) у некоторых пациентов, прежде чем они были подвергнуты оперативному лечению.

Видимо, у наблюдающих за этими пациентами эндокринологов произошло преломление существующих клинических рекомендаций в связи с более “мягким”, “доброкачественным” течением АИТ, ориентацией клиницистов на возможное “самоизлечение” БГ при сочетании ее с высокими титрами АТ-ТПО, что для врача-клинициста всегда указывает на наличие АИТ, а также отсутствием выраженного зоба, в ряде случаев – прогрессивного уменьшения объема ЩЖ на фоне проводимой медикаментозной терапии.

Нашими результатами показано, что подавляющее большинство пациентов с длительным, “мягким” течением БГ, не подвергнутых оперативному лечению в регламентированные сроки, имели 2-й и 3-й гистологические варианты заболевания. Также предиктором более “мягкого” течения БГ, с небольшими размерами зоба и тиреотоксикозом легкой и средней степени тяжести, является мужской пол. Так, среди пациентов со 2-м гистологическим вариантом преобладали мужчины (62%, $\chi^2 = 5,7$, $p < 0,05$), в то время как пациенты с 1-м вариантом были только женщины (100%), что несколько противоречит установленной ранее закономерности более тяжелого течения тиреотоксикоза у мужчин, но хорошо согласуется с известной закономерностью о меньшей вероятности ремиссии БГ на фоне консервативной терапии у мужчин. Узловые образования фиксировались с одинаковой частотой у мужчин и женщин при всех гистологических вариантах БГ ($p > 0,05$).

Максимальный уровень секреции TNF- α мононуклеарными лейкоцитами крови и количество экспрессирующих TNF-RI лейкоцитов регистрировались в контрольной группе, что свидетельствует о подавлении системы “лиганд–рецептор” TNF- α

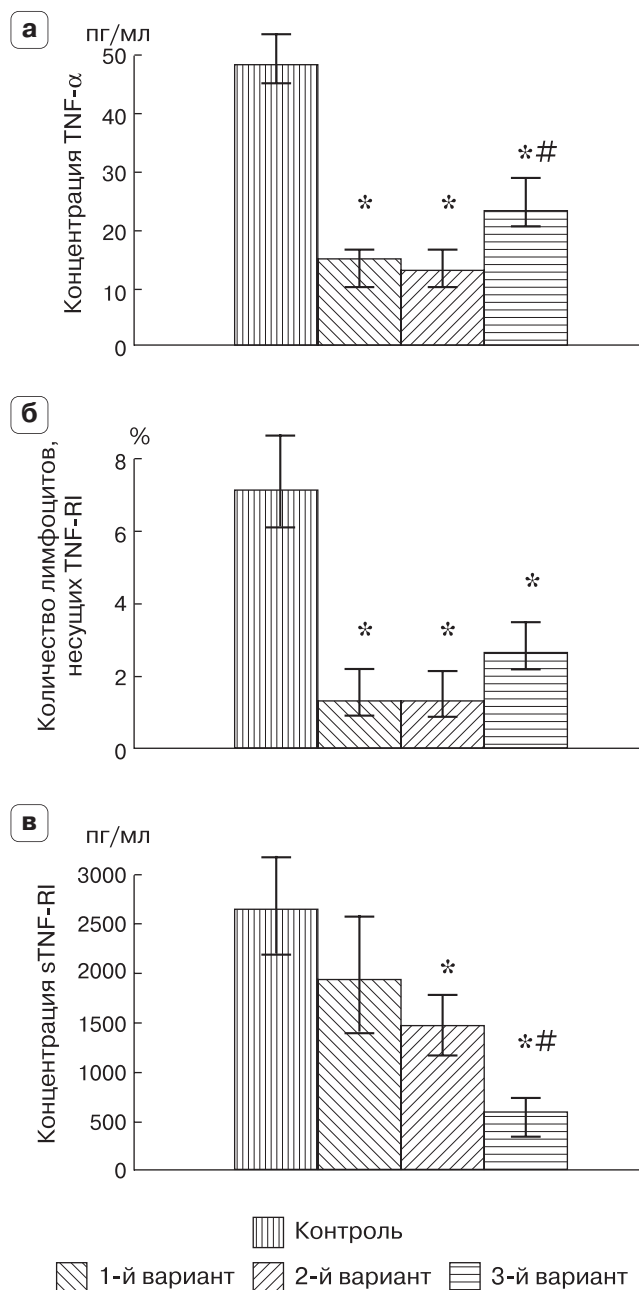


Рис. 2. Концентрация TNF- α (а) и sTNF-RI (в) в супернатантах культуральных сред мононуклеарных лейкоцитов и количество лимфоцитов, несущих TNF-RI (б), у пациентов с БГ с различными гистологическими вариантами (1–3) перестройки паренхимы ЩЖ (медиана, доверительный интервал) относительно контрольной группы.

у пациентов с БГ. Относительно большие показатели этой системы фиксировались в подгруппе пациентов с 3-м гистологическим вариантом БГ, где имели место онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия (рис. 2, а и б) и “мягкое” клиническое течение АИТ. С другой стороны, концентрация в куль-

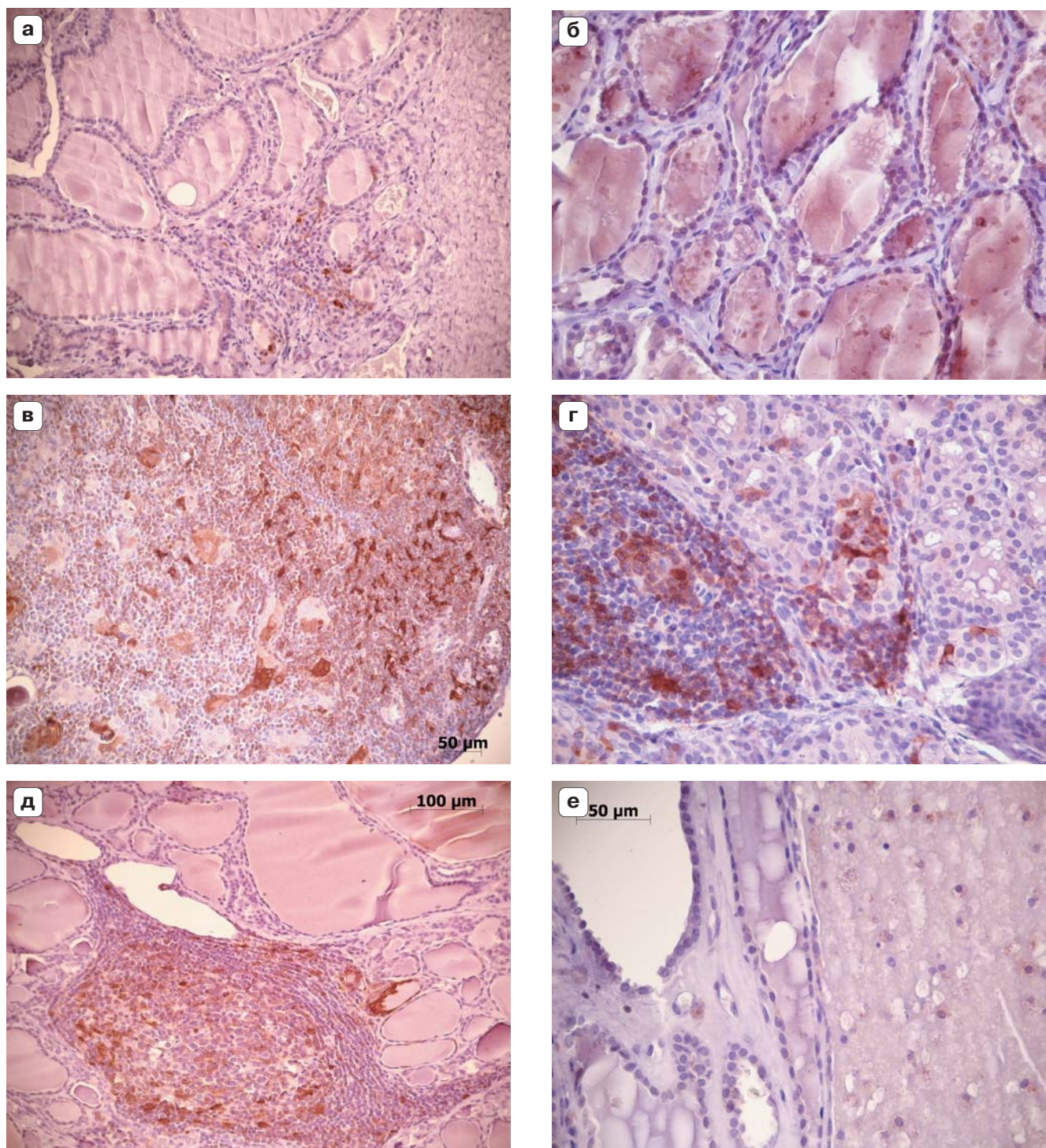


Рис. 3. Варианты экспрессии TNF-R1 в паренхиме ЩЖ при различных вариантах АИТП (а–д) и коллоидном пролиферирующем зобе (е).

- а – характер экспрессии TNF-R1 при БГ (1-й гистологический вариант). $\times 70$.
- б – характер экспрессии TNF-R1 при БГ (2-й гистологический вариант). $\times 150$.
- в – характер экспрессии TNF-R1 при БГ (3-й гистологический вариант с онкоцитарной перестройкой фолликулярного эпителия). $\times 70$.
- г – макрофаги, экспрессирующие TNF-R1, и фолликулы с онкоцитарной перестройкой у пациента с БГ. $\times 150$.
- д – лимфоидный фолликул, состоящий из клеток с выраженной экспрессией TNF-R1 при АИТ. $\times 70$.
- е – практически полное отсутствие экспрессии TNF-R1 у пациентки с коллоидным зобом и кистозной дегенерацией, единичные макрофаги внутри фолликула. $\times 150$.

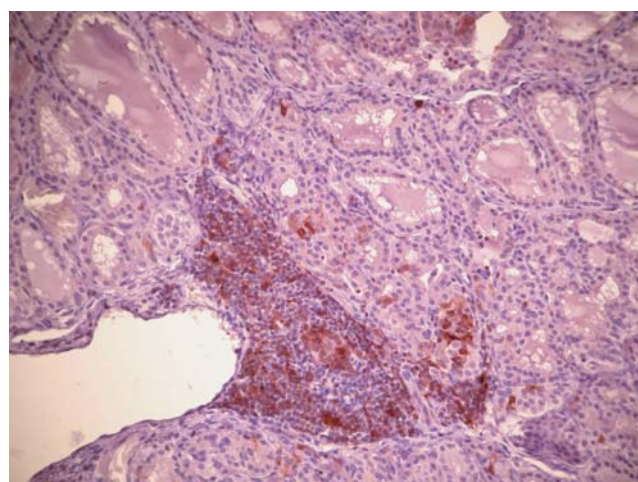
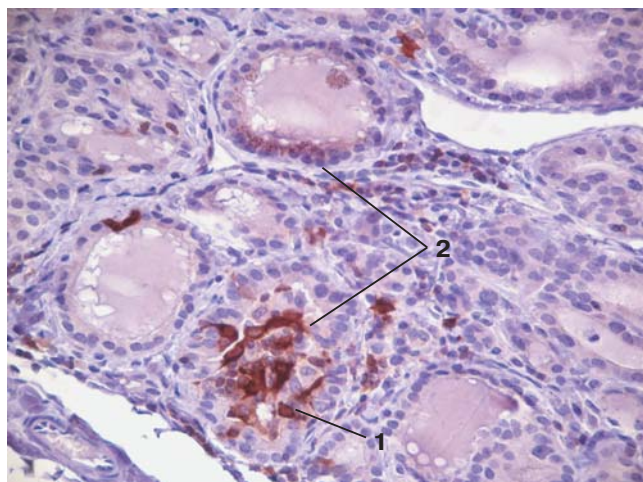


Рис. 4. Взаимосвязь экспрессии TNF-RI на инфильтрирующих паренхиму ЩЖ мононуклеарных лейкоцитах и онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия ЩЖ при БГ.

Слева: 1 – макрофагальная инфильтрация внутри фолликула, клетки экспрессируют TNF-RI; 2 – участки онкоцитарной трансформации фолликулярного эпителия, пациент с БГ. $\times 400$.

Справа: онкоцитарная трансформация фолликулярного эпителия вблизи массивной моноцитарно-макрофагальной инфильтрации ЩЖ при БГ. $\times 150$.

туральных средах рецептора–“ловушки”, sTNF-R, уменьшающего биологические эффекты цитокина, также в 3-й подгруппе оказалась самой низкой среди исследуемых вариантов БГ (рис. 2, в).

При сопоставлении культуральных и гормональных параметров были получены прямые корреляционные взаимосвязи между степенью выраженности экспрессии TNF-RI (оцененной в баллах) и возрастом пациентов ($r = 0,5$, $p = 0,01$) и курением ($r = 0,5$, $p = 0,04$). Также получена обратная корреляционная связь выраженности экспрессии TNF-RI и уровня ТТГ ($r = -0,4$, $p = 0,03$). Полученные данные подчеркивают взаимосвязь морфофункционального состояния клеток воспалительного инфильтрата и функционального состояния ткани ЩЖ при АИТП.

Самым интересным, на наш взгляд, является распределение экспрессии TNF-RI в ткани ЩЖ при АИТП. Специфическое иммуногистохимическое окрашивание обнаружено только на клетках, инфильтрирующих паренхиму ЩЖ, и не определялось в фолликулярном эпителии ЩЖ. Кроме того, в составе клеточных инфильтратов не все клетки экспрессировали TNF-RI. Клетки, экспрессирующие TNF-RI, отличались крупным линейным размером (более 15 мкм), имели крупное ядро, неровные контуры, что позволило причислить их к моноцитарно-макрофагальной системе. Во-вторых, во всех случаях, где зафиксированы моноциты/макрофаги, несущие TNF-RI, в непосредственной близости происходили специфическая реакция паренхимы и образование тиреоидных фолликулов с клетками Ашкенази–Гюртле, выраженность этой реакции варьиро-

вала от единичных клеток до тотальной онкоцитарной трансформации тиреоидного эпителия (рис. 3, 4).

Спецификой аутоиммунного воспаления ЩЖ является то, что помимо моноцитов и антигенспецифических Т-лимфоцитов крови продуцировать TNF- α способны фолликулярные клетки ЩЖ [10].

Однако в нашем исследовании мы не получили окрашивания фолликулярного эпителия при детекции TNF-RI. Экспрессировали данный рецептор только клетки с моноцитарно/макрофагальной морфологией, располагающиеся в зоне инфильтрата. Также не получено экспрессии данного рецептора фолликулярным эпителием при коллоидном пролиферирующем зобе (группа сравнения). В некоторых участках фолликула визуализировалась экспрессия TNF-RI только при наличии “инвазии” фолликула моноцитом/макрофагом, экспрессирующим TNF-RI (рис. 4).

Обсуждение

Известно, что TNF- α играет важную роль в развитии БГ. Так, при БГ TNF- α может усиливать абберантную экспрессию молекул адгезии и HLA II класса на поверхности тиреоцитов, что способствует запуску аутоиммунных процессов в ЩЖ. Также, наряду с IL-2 и IFN- γ , цитокин участвует в регуляции продукции аутоантител, стимулирует пролиферацию антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов, образующих клоны к различным антигенным эпитопам, усиливает синтез гликозаминогликанов в ретроорбитальных фибробластах, способствуя развитию офтальмопатии при БГ. Кроме того, TNF- α моду-

лирует функционирование и пролиферацию фолликулярных клеток ЩЖ [1]. В отношении TNF- α было доказано, что его источниками в ткани ЩЖ являются как инфильтрирующие ткань железы моноциты и Т-лимфоциты, так и тиреоидный эпителий. Доказанными функциональными эффектами TNF- α в ткани ЩЖ являются угнетение пролиферации тиреоцитов и ингибирование NIS/захвата йода, что может приводить к гипотиреозу [1].

Известно, что пролиферативная активность тиреоидного эпителия при БГ выше, чем при АИТ. Согласно некоторым исследованиям, уровень апоптоза лимфоцитов при БГ не повышается в отличие от АИТ, что может свидетельствовать о пролиферативной направленности патологических процессов при БГ на фоне выраженного аутоиммунного воспаления, реализуемого через механизм продукции АТ-рТТГ с ярко выраженными тиреоидстимулирующими свойствами [11]. Этот факт можно рассматривать и как следствие уменьшения количества TNF-RI-презентирующих лимфоцитов, что и было зафиксировано в проведенном нами ранее исследовании [12].

Существуют доказательства вовлеченности абберантной продукции и рецепции TNF- α в иммунопатогенез АИТП, как АИТ, так и БГ. Так, в ряде исследований показана ассоциация различных полиморфизмов гена TNF- α и БГ в различных популяциях [13, 14, 15, 16, 17]. В недавнем исследовании был выявлен TNFb3-TNF-308 G гаплотип, имеющий самую сильную ассоциацию с БГ, по данным современного метаанализа [18].

Тем не менее многими исследователями показано, что продукция TNF- α лимфоцитами крови больных с БГ близка к нормальной и возрастает лишь на фоне терапии радиоактивным йодом. Концентрация TNF- α в сыворотке крови чаще всего не увеличена [19]. В некоторых исследованиях у больных с БГ регистрировались более низкие показатели TNF- α мРНК в ткани ЩЖ, чем у пациентов с АИТ. По мнению авторов, дефицит интратиреоидной продукции TNF- α у пациентов с рецидивом БГ соответствует дефициту продукции TNF- α клонами Т-лимфоцитов, изолированных от ЩЖ [20, 21].

Нашей группой в ранее проведенных исследованиях показано, что у пациентов с БГ количество TNF-RI-презентирующих лимфоцитов значимо снижалось как в группе манифестного гипертиреоза, так и на фоне эутиреоза в условиях проводимой тиреостатической терапии. Также отмечалось достоверное снижение продукции TNF- α мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* по сравнению с контрольной группой [12]. Наши данные согласуются с результатами других исследователей, регистрирующих снижение концентрации TNF- α в крови при БГ [22].

Таким образом, данные, касающиеся роли системы TNF- α при БГ, остаются противоречивыми. На фоне выраженной ассоциации полиморфных маркеров гена TNF- α с заболеваемостью БГ обнаруживается весьма слабая динамика концентраций данного цитокина как в сыворотке, так и в культуральных средах мононуклеарных лейкоцитов.

При анализе иммуногистохимической детекции рецептора TNF- α в паренхиме ЩЖ, как морфологической основе для проведения сигналов цитокина и обеспечения его функциональных эффектов (угнетение пролиферации тиреоцитов и ингибирование NIS/захвата йода), было зарегистрировано отсутствие специфического свечения в клетках фолликулярного эпителия. Маркер идентифицировался в мононуклеарных клетках воспалительного инфильтрата. При морфологическом анализе данный тип клеток можно отнести к клеткам моноцитарно-макрофагальной линии.

Интересны клинко-морфологические параллели с цитокинпродуцирующей и рецепторной активностью мононуклеарных клеток крови при БГ. Известно, что в ЩЖ могут параллельно протекать процессы, свойственные для БГ и АИТ. При разбивке операционного материала ЩЖ пациентов с БГ, подвергнутых оперативному лечению, на 3 гистологических варианта при 3-м варианте с минимальной активностью признаков, характерных для БГ (зоб, выраженность АИТ, титр АТ-рТТГ), и клинко-лабораторными маркерами АИТ (большой титр АТ-ТПО, “мягкий” гипертиреоз, меньшие объем железы и онкоцитарная перестройка тиреоидного эпителия) регистрировалось менее выраженное подавление системы “лиганд–рецептор” TNF- α : относительно других вариантов большая секреция TNF- α культурой мононуклеарных лейкоцитов, большее количество лимфоцитов, несущих TNF-RI, и самые низкие концентрации рецептора–“ловушки”, ограничивающего биологический ответ клеток на TNF.

Эти результаты указывают на менее выраженное ингибирование системы цитокина и его рецепторов в иммунопатогенезе АИТ, нежели БГ. Аналогично нашим данным, результатами последних лет [23] показано, что средние концентрации TNF- α относительно выше при ремиссии БГ, нежели в активной фазе заболевания и при тяжелой, рефрактерной к терапии БГ, а концентрация sCD40L (выделяемого активированными Т-клетками и являющегося маркером активности аутоиммунного воспаления при БГ), наоборот, ниже. Эти данные указывают на переключение Th2-ответа на Th1-хелперный ответ, необходимый для индукции ремиссии при БГ. Также были выявлены самые высокие сывороточные концентрации рецепторов–“ловушек” TNF-RI и TNF-RI

у пациентов с активной фазой БГ в сравнении с пациентами в ремиссии БГ и неактивной фазе. Таким образом, общий вывод по системе TNF- α при БГ заключается в следующем: подавление этой системы связано с самим заболеванием (БГ) и с выраженностью его проявлений, и наоборот, активизация этой системы свидетельствует о переключении на “благоприятный” для БГ Th1-хелперный ответ и ассоциирована с “мягким” клиническим течением БГ и появлением морфологических черт АИТ.

Благодарность

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов Президента РФ (№ 16.120.11.1233-МД, № 16.120.11.614-НШ); Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (соглашение № 8302), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 12-04-31949 мол_а).

Список литературы

1. Саприна ТВ, Прохоренко ТС, Рязанцева НВ, Ворожцова ИИ. Цитокинопосредованные механизмы формирования аутоиммунных тиреопатий. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2010;6(4):22-27.
2. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling; internalized TNF receptosomes as death vesicles. J Immunity. 2004;21(3):415-428.
3. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(8):655-662.
4. Uno S, Imagawa A, Okita K et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. Diabetologia. 2007;50(3):596-601.
5. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. Gen Physiol Biophys. 2007;26(3):159-167.
6. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling; internalized TNF receptosomes as death vesicles. J Immunity. 2004;21(3):415-428.
7. Криволапов ЮА, Леенман ЕЕ. Морфологическая диагностика лимфом. СПб.: Издательско-полиграфическая компания “Коста”, 2006. 208 с.
8. Пругло МЮ. Критерии весовой и морфологической оценки щитовидной железы в условиях нормы и патологии. Под ред. И. Секине, Т.М. Вилера, С.И. Иржанова. Алматы, 2000. 117 с.
9. Хмельницкий ОК. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: Сотис, 2002.
10. Weetman AP, Ajjan RA. Cytokines and autoimmune thyroid disease. HOT THYROIDOLOGY (www.hotthyroidology.com). 2002;1.
11. Дрометр ДА. Иммунологические аспекты формирования патологических состояний щитовидной железы, сопровождающихся синдромом тиреотоксикоза (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Екатеринбург, 2009. 25 с.
12. Саприна ТВ, Прохоренко ТС, Резцова ВМ и др. Особенности продукции и рецепции цитокинов Th1/Th2-профиля при болезни Грейвса. Клиническая и экспериментальная тиреоидология. 2012;8(2):43-49.
13. Anvari M, Khalilzadeh O, Esteghamati A et al. Graves' disease and gene polymorphism of TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12, and IFN- γ . Endocrine. 2010;37(2):344-348.
14. Li N, Zhou Z, Liu X et al. Association of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) polymorphisms with Graves' disease: A meta-analysis. Clin Biochem. 2008;41(10-11):881-886.
15. Jurecka-Lubieniecka B, Ploski R, Kula D et al. Association between age at diagnosis of Graves' disease and variants in genes involved in immune response. PLoS One. 2013;8(3):59349.
16. Pan TR, Xing SM. Association of TNF- α gene polymorphisms with Graves disease susceptibility and early course thyroid stimulating hormone receptor antibody level in Chinese Han population in Anhui region. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2012;29(3):347-351.
17. Khalilzadeh O, Noshad S, Rashidi A, Amirzargar A. Graves' ophthalmopathy: a review of immunogenetics. Curr Genomics. 2011;12(8):564-575.
18. Kammoun-Krichen M, Bougacha-Elleuch N, Rebai A et al. TNF gene polymorphisms in Graves' disease: TNF-308 A/G meta-analysis. Ann Hum Biol. 2008;35(6):656-661.
19. Jones B. Effect of radio-active iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increase in IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-alpha, with longer term increase in IFN-gamma production. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84:4106-4110.
20. Aust G. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. Clin Exp Immunol. 1996;105:148-154.
21. Paschke R. Lack of intrathyroidal tumor necrosis factor alpha in Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 1993;76:97-102.
22. Salvi M. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. Eur J Endocrinol. 2000;143:197-202.
23. Yamamoto K, Itoh M, Okamura T et al. Relative levels of the inflammatory cytokines TNF α and the soluble CD40 ligand (sCD40L) profile in serum correlate with the thyrotoxic activity of Graves' disease. Thyroid. 2012 Mar 8. [Epub ahead of print].