

Фенотипический профиль и факторы индукции апоптоза лимфоцитов крови у больных диффузным токсическим зобом

Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В., Васильева О.А., Недосекова Ю.В., Бармина С.Э.

Phenotypic profile and factors of blood lymphocytes apoptosis induction in patients having diffuse toxic goiter

Ourazova O.I., Kravets Ye.B., Novitsky V.V., Rogalyova A.V., Vasilyeva O.A., Nedosekova Yu.V., Barmina S.E.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В. и др.

В статье обсуждаются особенности фенотипического профиля и факторы индукции апоптоза (уровень экспрессии на клетках CD95-антигена, содержание TNF- α в сыворотке крови) лимфоцитов периферической крови у больных диффузным токсическим зобом.

Ключевые слова: диффузный токсический зоб, иммунитет, лимфоциты, апоптоз.

Peculiarities of phenotypic structure and factors of apoptosis induction (level of CD95-antigen cell expression, blood serum content of TNF- α) of peripheral blood lymphocytes in patients with diffusive toxic goiter are discussed in the article.

Key words: diffuse toxic goiter, immunity, lymphocytes, apoptosis.

УДК 616.441-006.5:616.155.32-091.818

Введение

Заболевания щитовидной железы занимают одно из ведущих мест в структуре эндокринной патологии. К числу наиболее распространенных относятся тиреоидит Хасимото (аутоиммунный тиреоидит) и диффузный токсический зоб (ДТЗ). Оба заболевания характеризуются лимфоидной инфильтрацией щитовидной железы и наличием в сыворотке крови антитиреоидных антител. При аутоиммунном тиреоидите происходит гибель клеток железы и их замещение лимфоидными элементами, а при ДТЗ — активация и пролиферация тиреоцитов. Однако причины и механизмы повышенной пролиферации клеток при болезни Грейвса остаются до конца не изученными [5]. Патогенез нарушений иммунной системы при ДТЗ является актуальной проблемой не только эндокринологии, но и иммунологии, генетики и других медицинских наук. Наибольшее патологическое значение при ДТЗ отводится двум видам антител — длительно дейст-

вующему тиреостимулятору (LATS-фактору) и иммуноглобулинам, активирующим рост щитовидной железы, — ростстимулирующим иммуноглобулинам (РСИ). При этом тиреотропная функция гипофиза выходит из-под контроля регулирующих ее факторов, что ведет к нарушению функционирования щитовидной железы и гипертиреозу [3, 10].

В результате ряда исследований было показано, что тиреотоксикоз может оказывать выраженное иммунодестабилизирующее действие. Подобное влияние опосредуется изменением числа и активности субпопуляций Т-лимфоцитов, естественных киллеров (ЕК-клеток — CD16⁺, CD56⁺), количества рецепторов к интерлейкину-2 (ИЛ-2), чувствительности CD4-клеток к тиреоидному антигену [1, 3, 11, 18]. Однако дисбаланс иммунитета при ДТЗ является не только следствием, но и причиной заболевания, к развитию которого предрасполагает дефект механизмов иммунологического надзора, связанный с дефицитом супрессорных факторов и активацией Т-хелперных (CD4⁺) лимфоцитов. Данный

дефект допускает выживание «запретного» клона органоспецифических (ориентированных к собственным антигенам щитовидной железы) Т-лимфоцитов, образующихся в результате случайных мутаций [17].

Соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов также играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза при ДТЗ [13]. Провоспалительные цитокины, в частности фактор некроза опухоли- α (tumor necrotic factor — TNF- α), активируют пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Кроме того, TNF- α — гомолог Fas-лиганда (Fas-L) — является наиболее апоптогенным из цитокинов [2].

В настоящее время доказана связь между нарушением апоптоза клеток иммунной системы и развитием ряда заболеваний. Fas-антиген (CD95) является мембранным клеточным рецептором, индуцирующим апоптоз Т-лимфоцитов и ряда клеток других линий. Экспрессия CD95 отражает готовность клетки к апоптотическому стимулу [4, 16]. Взаимодействие Fas-рецептора (Fas-R) с соответствующим лигандом — Fas-L — формирует сигнал к апоптозу на поверхности активированных Т-лимфоцитов, но при этом оказывает антиапоптотное действие на «покоящиеся» Т-клетки [8]. На мембране нормально функционирующих тиреоцитов отмечается незначительная экспрессия Fas-R на фоне активной презентации Fas-L, что, предположительно, обеспечивает защиту щитовидной железы от воздействия аутореактивных клеток иммунной системы. Формирование аутоиммунного процесса в щитовидной железе сопровождается усилением экспрессии на мембране тиреоцитов Fas-R, что делает их доступными для цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов, презентующих Fas-L. Одновременная экспрессия Fas-L и Fas-R ведет к запуску апоптоза и усугублению аутоиммунного процесса [15].

Учитывая тот факт, что дисрегуляции иммунитета и апоптоза являются ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в том числе болезни Грейвса, целью настоящего исследования явилась оценка фенотипического профиля лимфоцитов периферической крови, содержания TNF- α в сыворотке крови и численности «предуготовленных» к апоптозу (CD95⁺) лимфоцитарных клеток у больных ДТЗ.

Материал и методы

В основу работы были положены результаты обследования 15 пациентов (5 мужчин и 10 женщин) в

возрасте 19—60 лет, больных ДТЗ с тиреотоксикозом различной степени тяжести. Диагноз ДТЗ устанавливали по наличию выраженной клинической картины, данных ультразвукового исследования щитовидной железы, содержанию тиреотропного гормона (ТТГ) и свободного тироксина (сТ₄) в сыворотке крови.

В качестве сравнения была сформирована контрольная группа, в которую вошли 15 практически здоровых доноров (3 мужчин и 12 женщин) аналогичного возраста.

Материалом исследования служили лимфоциты и сыворотка периферической крови.

Выделение лимфоцитов из крови осуществляли на градиенте плотности фиколл-урографина 1,077 г/см³ [6].

Фенотипический профиль лимфоцитов периферической крови исследовали с помощью лимфоцитотоксического теста с использованием моноклональных антител к дифференцировочным антигенам (НПО «Сорбент», г. Москва) [7].

Содержание TNF- α в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора « α -ФНО-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно рекомендациям производителя.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием программы Statistica 6.0 for Windows. Для оценки нормальности распределения выборочных данных применяли критерий Колмогорова—Смирнова. Обработку результатов проводили с использованием непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При обследовании контрольной группы у всех доноров обнаруживался нормальный уровень ТТГ и сТ₄ в крови, щитовидная железа (по данным УЗИ) имела нормальные размеры, форму, структуру и экзогенность. Концентрация ТТГ в крови у больных ДТЗ была более 0,1 МЕ/л, уровень сТ₄ оказался повышенным до (44,6 ± 11,2) пмоль/л.

Исследование фенотипического профиля лимфоцитов у больных ДТЗ выявило статистически значимое снижение относительного количества CD3⁺- ($p < 0,05$) и CD8⁺- ($p < 0,001$) клеток по сравнению с таковым

у здоровых доноров. Между тем отмечалось увеличение количества CD20⁺-клеток и иммунорегуляторного индекса (ИРИ) ($p < 0,01$). Достоверных изменений численности CD4⁺- и CD56⁺-клеток не установлено (таблица).

CD-популяционный состав лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров и больных диффузным токсическим зобом ($X \pm m$), %

Лимфоциты	Здоровые доноры ($n = 15$)	Больные диффузным токсическим зобом ($n = 15$)
CD3 ⁺	75,22 ± 1,68	66,00 ± 3,26 ($p < 0,05$)
CD4 ⁺	44,89 ± 1,75	43,57 ± 2,51
CD8 ⁺	25,44 ± 1,52	13,85 ± 1,05 ($p < 0,001$)
CD20 ⁺	5,67 ± 0,67	10,00 ± 1,06 ($p < 0,01$)
CD56 ⁺	14,44 ± 1,38	10,57 ± 1,63
CD95 ⁺	12,56 ± 0,69	24,44 ± 2,91 ($p < 0,01$)
ИРИ	1,81 ± 0,14	3,29 ± 0,34 ($p < 0,01$)

Примечание. n — количество обследованных; ИРИ — иммунорегуляторный индекс (частное от деления количества CD4⁺-клеток на количество CD8⁺-клеток).

Как указывалось выше, болезнь Грейвса является ярким примером органоспецифической аутоиммунной патологии, в основе которой лежит дефицит иммуносупрессорных факторов, что позволяет выживать «запретным» клонам лимфоцитов [3]. Поскольку CD3-антиген является маркером общей фракции Т-лимфоцитов, снижение числа CD3⁺-Т-клеток при ДТЗ свидетельствует о Т-дефиците, формирование которого, судя по полученным данным, было связано с уменьшением количества цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов, часть из которых, как известно, за счет экспрессии ингибирующих рецепторов (KIR) способна вызывать иммуносупрессию. Выраженное повышение ИРИ также обуславливалось снижением числа CD8⁺-лимфоцитов и возрастанием относительной доли CD4⁺-Т-хелперов. Наряду с этим повышение относительного количества CD20⁺-клеток при ДТЗ указывает на усиление гуморальной реакции иммунной системы, следствием которого, как известно, может быть избыточная продукция антител к антигенам щитовидной железы, определяющая прогрессирование болезни. Подобные данные встречаются в публикациях других авторов [5, 18]. Вместе с тем, согласно сведениям литературы, сниже-

ние числа CD8⁺-клеток при ДТЗ, как правило, сочетается с уменьшением количества ЕК-клеток [17—19].

В целом установленный у больных ДТЗ дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови свидетельствует о преобладании Th2-типа иммунного реагирования, сопровождающегося повышением количества циркулирующих В-лимфоцитов.

Механизмы пролиферации и регуляции процессов дифференцировки клеток крови в направлении Т- и В-линий к настоящему времени достаточно полно охарактеризованы. Между тем патогенетические факторы и механизмы дизрегуляции апоптоза в условиях реализации аутоиммунитета еще мало исследованы. Однако при многих иммунопатологических состояниях нарушения именно этой программы становятся основополагающими в определении характера и тяжести течения заболевания.

Апоптоз имеет место как в клетках неповрежденных, нормальных тканей, так и в тканях с наличием патологического процесса. При апоптозе происходит удаление из организма «нежелательных» клеток — состарившихся, мутантных, злокачественных, трансформированных вирусом, а также нормальных клеток с целью поддержания постоянства клеточного состава тканей [7, 9, 12].

Инициаторная фаза апоптоза может осуществляться посредством так называемых «рецепторов смерти». Наиболее изучен в данном аспекте Fas-опосредованный апоптоз CD95⁺-клеток, главным условием реализации которого является взаимодействие мембранного Fas-рецептора и Fas-лиганда [9].

Результаты проведенного исследования показали, что у больных ДТЗ отмечалось увеличение количества CD95⁺-лимфоцитов в среднем в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (см. таблицу).

Зрелые Т- и В-лимфоциты в покое лишены мембранного Fas-рецептора и экспрессируют протоонкогены Bcl-2 и Bcl-x_l, что определяет их устойчивость к индукторам апоптоза. Положение меняется на обратное при активации лимфоцитов. Поскольку уровень экспрессии Fas-рецептора отражает готовность клетки к апоптозу, которая в условиях активации лимфоцитов аутоантигеном (как это происходит при аутоиммунных тиреопатиях) и взаимодействия Fas-R с Fas-L реализуется в гибель клетки, то увеличение числа CD95⁺-лимфоцитов при ДТЗ вполне

обоснованно может расцениваться в качестве признака не только их повышенной «предуготовленности» к апоптозу, но и активации запрограммированной гибели клеток [9, 12, 14].

Другая область функционирования иммунной системы, для которой реализация апоптоза является важной, — изоляция иммунологически «привилегированных» зон от проявлений активности эффекторных клеток. К числу таких зон относится ткань щитовидной железы, клетки которой, как было замечено выше, с целью «самообороны» экспрессируют Fas-лиганд. В результате эффекторные Т-лимфоциты, экспрессирующие Fas-рецептор, неизбежно гибнут в процессе миграции через данный барьер вследствие взаимодействия Fas-рецептора с Fas-лигандом барьерных клеток. Таким образом, можно полагать, что снижение числа цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов при ДТЗ является следствием реализации апоптоза агрессивных по отношению к щитовидной железе клеток-«мигрантов». С другой стороны, гибель CD8⁺-лимфоцитов с супрессорной активностью может индуцировать «срыв» аутоотолерантности и экспансию аутоагрессивных Т-клеток, в норме имеющих ограниченное распределение в иммунной системе [4, 9].

Помимо APO-1/CD95 к числу рецепторов клеточной гибели относятся TNF- α -рецепторы — TNF-R1 и TNF-R2. Цитокины, в частности TNF- α , играют немаловажную роль в модуляции апоптоза и селекции иммунокомпетентных клеток путем угнетения либо запуска программы их естественной гибели. Обнаружена, к примеру, способность TNF- α (равно как и ряда иных провоспалительных цитокинов — IL-1, -2, интерферона- γ и других) индуцировать экспрессию Fas-R на мембране CD95⁺-клеток. Кроме того, апоптоз, индуцированный связыванием TNF- α с TNF-R1, подобно взаимодействию Fas-R с Fas-L, может осуществляться через путь FADD — каспаза-8, а также сходный с ним адапторный белок TRADD (TNF-R-associated death domain).

В то же время гиперэкспрессия TRADD ведет не только к запуску процессов апоптоза, но и к активации ядерного фактора kB (NFkB), который предотвращает TNF-индуцированную гибель клетки [4, 8, 9, 14].

Изучение содержания TNF- α у больных ДТЗ показало повышение концентрации цитокина практически в 5 раз относительно значений в контрольной группе

(до $(6,62 \pm 1,11)$ пг/мл при норме $(1,34 \pm 0,25)$ пг/мл; $p < 0,01$).

В литературе имеются данные о том, что при контакте с антигеном происходит активация антигенраспознающей функции иммунокомпетентных клеток с последующей выработкой ими ряда цитокинов, индуцирующих аутоиммунный процесс, в частности TNF- α . Последний играет важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, поскольку принимает непосредственное участие в регуляции пролиферации антигенспецифических клонов Т- и В-лимфоцитов и продукции аутоантител. Также он обладает способностью усиливать экспрессию на поверхности тиреоцитов антигенов гистосовместимости II класса, что может обуславливать нарушение процессов антигенного распознавания и запуск антиреоидного иммунитета [8, 14]. Наряду с этим известно, что TNF- α осуществляет коррекцию численности цитотоксических лимфоцитов, поражающих щитовидную железу, т.е. представляет собой некий компонент защитной реакции макроорганизма, контролирующей «силу» аутоиммунного процесса [8, 12]. Данный факт позволяет предположить, что повышение содержания TNF- α в крови у больных ДТЗ может быть не только критерием оценки активности аутоиммунного процесса, но и благоприятным прогностическим признаком, что совершенно очевидно зависит от степени увеличения концентрации цитокина, которая является либо «полезной», либо «вредной» для организма.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно сделать допущение о том, что при ДТЗ дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов в направлении В-клеточного звена иммунитета обуславливается подавлением численности CD3⁺, CD8⁺-лимфоцитов, одной из возможных причин которого является стимуляция апоптоза клеток за счет увеличения экспрессии CD95 и содержания TNF- α в крови.

Выводы

1. Течение ДТЗ сопровождается изменением субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, в основе которого лежит снижение содержания CD3⁺, CD8⁺-клеток в сочетании с повышением числа CD20⁺-лимфоцитов.

2. Признаками стимуляции апоптоза при ДТЗ являются увеличение содержания «предуготовленных» к апоптозу CD95⁺-лимфоцитов и концентрации TNF-α в крови.

Литература

1. *Абрамова Н.А., Фадеев В.В.* Консервативное лечение болезни Грейвса: принципы, маркеры рецидива и ремиссии // Проблемы эндокринологии. 2005. Т. 51. № 6. С. 44—49.
2. *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.
3. *Калинин А.П., Потемкина Е.Е., Пешева Н.В. и др.* Иммунологические аспекты аутоиммунного тиреоидита // Проблемы эндокринологии. 1994. Т. 40. № 1. С. 56—58.
4. *Кориунов А.М., Преображенская И.С.* Программированная смерть клеток (апоптоз) // <http://longevity-library.narod.ru/1/1.1/1.1.19.htm>.
5. *Крайнова С.И., Крюкова И.В., Мкртумова Н.А. и др.* Стимуляция роста «нормальных» тиреоцитов лимфоцитами, инфильтрирующими ткань диффузного токсического зоба // Проблемы эндокринологии. 2001. Т. 47. № 3. С. 3—5.
6. *Новиков А.К., Новикова В.И.* Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979. 216 с.
7. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др.* Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях: Методические рекомендации для научных работников и врачей практического здравоохранения // Иммунология. 1993. № 6. С. 51—62.
8. *Потанин М.П.* Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237—242.
9. *Рыжов С.В., Новиков В.В.* Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Рос. биотерапевт. журн. 2002. Т. 1. № 3. С. 27—33.
10. *Старкова Н.Т.* Руководство по клинической эндокринологии. 3-е изд. СПб.: Питер, 2002. 576 с.
11. *Фадеев В.В., Абрамова Н.А., Прокофьев С.А. и др.* Антитела к рецептору тиреотропного гормона в дифференциальной диагностике токсического зоба // Проблемы эндокринологии. 2005. Т. 51. № 4. С. 10—18.
12. *Ярилин А.А.* Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // <http://www.eyenews.ru/stati182.htm>
13. *Ajjan R.A., Weetman A.P.* Cytokines in thyroid autoimmunity // Autoimmunity. 2003. V. 36. P. 351—359.
14. *Blagosklonny M.* Cell death beyond apoptosis // Leukemia. 2000. V. 14. P. 1502—1518.
15. *De Maria R., Testi R.* Fas-Fas L interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity // Immunology today. 1998. V. 19. P. 121—250.
16. *Van Parijs L., Biuckians A., Abbas A.K.* Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes // Immunology. 1998. V. 160. P. 2065—2071.
17. *Volpe R.* Autoimmune thyroid disease — a perspective // Molec. Biol. Med. 1986. V. 3. № 1. P. 25—51.
18. *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.
19. *Weetman A.P.* Graves' disease 1835—2002 // Horm. Res. 2003. V. 59. P. 114—118.

Поступила в редакцию 06.09.2006 г.

Утверждена к печати 20.11.2006 г.