

УДК 616.441 – 006.5: 612.017.1

**СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА
У БОЛЬНЫХ ДИФFUЗНЫМ ТОКСИЧЕСКИМ ЗОБОМ
С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ТЕЧЕНИЕМ**

БЕЛОГЛАЗОВ В. А., КУЛАГИНА Ю. Ю., ГОРДИЕНКО А. И.

Крымского государственного медицинского университета
им. С. И. Георгиевского

Диффузный токсический зоб – ДТЗ (болезнь Грейвса, Базедова, Пэрри или Флайяни) – органоспецифическое аутоиммунное заболевание, которое характеризуется стойким патологическим повышением продукции тиреоидных гормонов, как правило, диффузно увеличенной щитовидной железой и последующим нарушением функционального состояния разных органов и систем, в первую очередь сердечно-сосудистой и центральной нервной систем [1].

В многочисленных исследованиях при ДТЗ выявляют дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и увеличение количества активированных поликлональных В-лимфоцитов и плазматических клеток, синтезирующих широкий спектр аутоантител в том числе и к рецептору к тиреотропину – тиреоид-стимулирующие иммуноглобулины класса Ig G [2,3].

С позиций поиска одного из интегральных механизмов индукции и самоподдержания аутоиммунного механизма патогенеза при ДТЗ наше внимание привлек эндотоксин (ЭТ) или липополисахарид (ЛПС) грамнегативной флоры кишечника.

ЭТ является классическим поликлональным активатором В-лимфоцитов и представляет собой основной структурный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий. По современным представлениям, системная реакция организма на ЭТ зависит как от его количества поступившего в организм, так и от функционального состояния ЭТ-связывающих систем макроорганизма. Помимо этого, при определенных условиях даже физиологическая транслокация ЭТ из просвета желудочно-кишечного тракта в портальную кровь может вызывать системную активацию клеточных элементов крови, среди которых особую роль играют нейтрофильные гранулоциты и моноциты. При этом одним из важнейших факторов, который определяет направление воздействия ЭТ на организм больного, является взаимодействие его с различными типами ЭТ-связывающих рецепторов, которые экспрессируются на плазматической мембране данных субпопуляций лейкоцитов [4,5,6].

Среди клеточных рецепторов, принимающих участие в распознавании ЭТ и активации путей внутриклеточной передачи сигнала, а также в нейтрализации и клиренсе ЭТ, выделяют CD14, β_2 -интегриновые рецепторы (CD11/CD18), скавенджер-рецепторы, L-селектины и др. Решающую роль в распознавании ЭТ грамнегативной бактерии и бактериальной ДНК играют CD14 рецепторы на клетках моноцитарно-макрофагального ряда, которые, не имея внутрицитоплазматического домена, передают сигнал Toll-like рецепторам, преимущественно TLR4 [6]. Однако роль изменений уровня экспрессии этих рецепторов в патогенезе ДТЗ пока еще остается практически неизученной [7].

Основным методом патогенетического лечения на сегодняшний день является консервативная терапия тиреостатическими препаратами (ТСТ). Вместе с тем, вероятность рецидива тиреотоксикоза после отмены лечения достигает 60-70%, в связи, с чем принципиальным является выявление прогностических факторов ответа больного на ТСТ [8].

В связи с этим **целью** данной работы было изучение особенностей экспрессии CD14 и ЭТ-связывающих рецепторов (ЭТ-Р) на моноцитах и гранулоцитах периферической крови у больных ДТЗ с различным ответом на ТСТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследована группа больных ДТЗ средней степени тяжести со сроком болезни от 1 месяца до 7 лет, находившихся в течении двух лет под нашим наблюдением. В периоде первичного обследования все пациенты находились на стационарном лечении в эндокринологическом отделении КРУ "Республиканская клиническая им. Н. А. Семашко". Клинический диагноз ДТЗ устанавливался на основании проведенного клинического и функционального обследования с верификацией стадий заболевания в соответствии с международной классификацией болезней [1].

Все больные были разделены на две группы. Первую группу (респондеры) составили 73 больных ДТЗ средней степени тяжести (27 мужчин и 46 женщин) в возрасте от 22 до 68 лет. У всех больных этой группы на протяжении двух

лет наблюдения не было ни одного рецидива и все они во время лечения в стационаре отличались хорошим ответом на проводимую ТСТ. Во вторую группу (нореспондеры) вошли 14 больных ДТЗ средней степени тяжести (9 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 22 до 68 лет. У этих больных за период нашего наблюдения отмечались тяжелые рецидивы основного заболевания все они отличались плохим ответом на проводимое лечение и наличием осложнений в виде дисметаболической кардиомиопатии, мерцательной тахикардии, симптоматической артериальной гипертензии и офтальмопатии.

Для сравнительного анализа полученных результатов изучено состояние антиэндотоксического иммунитета в группе здоровых доноров (контрольная группа - 32 здоровых донора), сопоставимых с больными ДТЗ по полу и возрасту.

Материалом исследования служила периферическая кровь, которую получали при поступлении больного на стационарный этап лечения.

Экспрессию рецепторов к ЭТ на мембранах поли и мононуклеарных лейкоцитов изучалась с помощью двухцветного иммунофлуоресцентного анализа методом проточной лазерной цитофлуориметрии, используя в качестве лиганда конъюгат ЛПС E. Coli K 235 с флуоресцеинизотиоцианатом (Fitc) по методике, разработанной в лаборатории клинической иммунологии

Крымского государственного медицинского университета [9] и моноклональных антител к CD 14 дифференцировочному антигену фирмы DakoCytomation, Denmark A/S. Использовали проточный цитофлуориметр PAS III и программное обеспечение PartecFloMax, SSC). Уровень экспрессии ET-связывающих рецепторов на каждом типе клеток выражали в условных единицах флуоресценции (усл.ед.флуор.), которые определяли на проточном цитометре с помощью функции Fit Gauss Peak, встроенную в программу Peak analysis при анализе не менее 10 тысяч клеток.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с использованием параметрических и непараметрических критериев программы Medstat» (серийный №MS000051) ДНПП ООО «Альфа», г.Донецк.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические, лабораторные и сонографические данных обследуемых больных ДТЗ представлены в таблице 1. Как следует из данных представленных в таблице 1 существенных различий клинических и лабораторных параметров в клинических группах не выявлено, за исключением гендерного распределения. Так, если в 1 группе преобладали лица женского пола – 61 человек (83,6%), то во 2 группе – мужского-8 человек (57,1%) .

Таблица 1

Клинические, лабораторные и ультразвуковые параметры больных ДТЗ

Показатели	1 группа (респондеры) n=73	2 группа (нореспондеры) n=14
Распределение по полу	Мужчины – 12 (16,4%)* Женщины – 61(83,6%)*	Мужчины – 8 (57,1%)* Женщины – 6 (42,9%)*
Распределению по возрасту	22-68 (43,3+9,4)	39-57 (50,22+5,8)
Длительность заболевания	От 1 мес. до 10 лет	От 6 мес. до 25 лет
T4 мкг/дл	69,8+32,9	78,1+16,7
ТТГ мЕд/л	1,81+0,52	1,99+0,63
Объем правой доли ЩЖ см3	28,73+6,85	24,34+4,02
Объем левой доли ЩЖ см3	30,28+4,16	27,05 +2,9

Примечание. * обозначена достоверность различий $p < 0,05$ и выше по непараметрическому критерию χ^2 Пирсона и χ^2 Пирсона с поправкой Йетса

Данные о состоянии клеточного антиэндотоксического иммунитета у больных ДТЗ в зависимости от наличия рецидива заболевания представлены в таблице 2.

Таблица 2

Клеточный антиэндотоксический иммунитет у больных ДТЗ

Показатель (усл.ед. флуор.)	Статистический показатель23	Норма n=32	1 группа («респондеры») n=73	2 группа («нореспондеры») n=14
Моноциты CD14	M ±m p p*	18,56 ±1,23	24,31 ±1,02 <0,05	17,00 ±0,79 >0,05 <0,01

Продолжение табл. 2

Показатель (усл.ед. флуор.)	Статистический показатель ²³	Норма n=32	1 группа («респондеры») n=73	2 группа («нореспондеры») n=14
Гранулоциты CD14	Me ±m p p*	0,93 ±0,05	0,95 ±0,03 >0,05	0,69 ±0,04 <0,01 <0,01
Моноциты ЭТ-Р	Me ±m p p*	2,15 ±0,16	2,34 ±0,08 =0,13	1,81 ±0,07 <0,05 <0,001
Гранулоциты ЭТ-Р	M ±m p p*	1,22 ±0,06	1,11 ±0,04 >0,05	0,87 ±0,08 =0,02 =0,02

Примечание. p - достоверность различий с уровнем здоровых лиц (норма).
p* - достоверность различий между соответствующими показателями 1 и 2 групп больных ДТЗ.

Как видно из таблицы 2 у больных ДТЗ 1 группы уровень экспрессии CD14 на моноцитах достоверно повышен до $23,31 \pm 1,02$ усл.ед.фл. ($p < 0,05$), тогда как экспрессия CD14 на гранулоцитах, а также экспрессия ЭТ-связывающих рецепторов (ЭТ-Р) на моноцитах и гранулоцитах у больных этой группы не выходит за рамки диапазона референсной нормы ($p > 0,05$).

У больных 2 группы нореспондеров на ТСТ выявлено достоверное снижение экспрессии CD14 на гранулоцитах до $0,69 \pm 0,04$ усл.ед.фл. ($p < 0,01$), а также экспрессии ЭТ-Р на моноцитах до $1,81 \pm 0,07$ усл.ед.фл. ($p < 0,05$) и на гранулоцитах до $0,87 \pm 0,08$ ($p = 0,02$). Также из таблицы видно, что у больных 2-ой группы все показатели достоверно ниже в сравнении с соответствующими показателями 1 клинической группы ($p < 0,01$).

Как показали наши данные клинически неблагоприятное течение ДТЗ у больных 2 группы характеризуется снижением ЭТ-Р рецепторов на моноцитах и гранулоцитах. В этой группе больных зарегистрирован «нормальный» уровень экспрессии CD 14 на моноцитах и сниженный на гранулоцитах. В определенной мере понять причину их снижения помогает параллельное изучение CD 14 и ЭТ-Р рецепторов. Как известно, связывание с помощью высокоаффинных антител к CD14 рецептору не блокирует полностью связывание ЭТ с клеточной мембраной [10]. Поэтому, использование ЛПС меченого Fitc позволяет выявить наличие функционально активных рецепторов к ЭТ. Так как это взаимодействие происходит в среде не содержащей плазму, следовательно содержания белка, связывающего ЛПС, посредством которого ЭТ воздействует на CD 14 рецептор, минимизировано. Таким образом, ЛПС меченный Fitc предоставляет возможность оценить свободные не CD14 структуры. Почему, у нореспондеров на ТСТ

снижено количество функционально активных рецепторов? Логичным ответом может быть то, что активный рецептор блокируется соответствующим лигандом т.е. ЭТ. Длительное воздействие на ЭТ рецепторы основных эффекторных клеток чрезмерного ЭТ стимула может приводить с одной стороны к персистентной продукции провоспалительных цитокинов, поликлональной активации В лимфоцитов, самоподдержанию аутоиммунного воспаления, с другой стороны способствовать блокированию активных рецепторных структур, что мы и наблюдали во 2 группе больных. Обращает на себя внимание факт более высокой экспрессии на моноцитах CD 14 рецепторов у респондеров на ТСТ по сравнению как с референсным диапазоном нормы, так и с группой нореспондеров. Активация данных ЭТ рецепторов в условиях дисбаланса гуморального и мукозального антиэндотоксинового иммунитета, которую мы выявили ранее [11] вероятно является адекватной ответной реакцией на избыточный ЭТ стимул в условиях патологии в 1 клинической группе.

ВЫВОДЫ

1. В 1 группе больных ДТЗ респондеров на ТСТ преобладали лица женского пола – 61 человек (83,6%), во 2 группе нореспондеров на ТСТ – мужского- 8 человек (57,1%) ($p < 0,05$)
2. У больных ДТЗ респондеров на ТСТ выявлено повышение экспрессии рецепторов CD14 на моноцитах до $23,31 \pm 1,02$ усл.ед.фл. ($p < 0,05$). В данной клинической группе уровень CD14 на гранулоцитах и экспрессия ЭТ-Р (LPS Fitc) на моноцитах и гранулоцитах периферической крови не выходит за пределы референсного диапазона нормы ($p > 0,05$)
3. У больных ДТЗ нореспондеров на ТСТ зарегистрировано снижение экспрессии CD14

на гранулоцитах до $0,69 \pm 0,04$ усл.ед.фл. ($p < 0,01$), ЭТ рецепторів на моноцитах і гранулоцитах периферической крові відповідно до $1,81 \pm 0,07$ усл.ед.фл. ($p < 0,05$) і $0,87 \pm 0,08$ усл.ед.фл. ($p = 0,02$).

4. Сравнительный межгрупповой анализ показывает, что у больных ДТЗ нонреспондеров на ТСТ все показатели характеризующие экспрессию ЭТ-связывающих рецепторов достоверно снижены по сравнению с больными респондерами на ТСТ, что является отражением уменьшения экспрессии активных рецепторов клеточного звена антиэндотоксического иммунитета и ассоциируется с более тяжелым клиническим течением ДТЗ в данной клинической группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Олійник В. А. Патологія щитовидної залози в Україні (епідеміологія та регіональні особливості) // Журнал практичного лікаря. – 2001.- №2. – С. 5-7.
2. Naik V. Immunopathogenesis of Thyroid Eye Disease: Emerging Paradigms/ Naik V., Naik M., Goldberg R., MD, Smith T.J. Douglas R.S. / Surv Ophthalmol. – 2010. – Vol.55. – N3. – P. 215-226.
3. El Fassi D. The rationale for B lymphocyte depletion in Graves' disease. Monoclonal anti-CD20 antibody therapy as a novel treatment option/ El Fassi D., Nielsen C.H., Hasselbalch H.C., Hegedus L Eur J Endocrinol. – 2006. – Vol.154. – N5. – P.623-32.
4. Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных эндотоксинов // Журнал микробиологии. – 2004. – №3. – С. 98-101.
5. Яковлев М.Ю. Роль системной эндотоксинемии в физиологии и патологии человека // Сборник трудов 1-ой сессии РМАПО. М. 1995. – с. 10-11.
6. Sander H. Diks et al. Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. // Journ. of Endotoxin Research. 2001. Vol. 7. N5. p. 335-348.
7. Antal-Szalmás P Evaluation of CD 14 in host defence // European Journal of Clinical Investigation- 2000. – Vol.30.- N2 – P 167-179.
8. A TSHR-LH/CGR chimera that measures functional thyroid-stimulating autoantibodies (TSAb) can predict remission or recurrence in Graves' patients undergoing antithyroid drug (ATD) treatment/Giuliani C., Cerrone D., Harih N., Thornton M., Kohn L.D. et al. // J Clin Endocrinol Metab. – 2012. – Vol.97. – N7. – P.1080-1087.
9. Метод визначення ендотоксинзв'язуючих рецепторів на моноцитах і гранулоцитах периферичної крові/ Гордієнко А.І., Білоглазов В.О., Хіміч Н.В. // Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №122ю – К., УКРМЕДПАТЕНТ ІНФОРМ., 2010 – 4с.
10. Triantafilou, M., Triantafilou, K. & Fernandez, N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration. Eur. J. Biochem. 2000. – Vol. 267, №10. – P. 2218-2226.
11. Кулагина Ю. Ю. Особенности гуморального антиэндотоксического иммунитета у больных диффузным токсическим зобом в зависимости от длительности заболевания/ Кулагина Ю. Ю., Белоглазов В. А., Гордиенко А. И., Бакова А. А. // Таврический медико-биологический вестник. – 2009, том 12, № 3 (47), С.53-55.

РЕЗЮМЕ

КЛІТИННИЙ АНТИЕНДОТОКСИНОВИЙ ІМУНІТЕТ У ХВОРИХ ІЗ ДИФУЗНИМ ТОКСИЧНИМ ЗОБОМ З РЕЦИДИВУЮЧИМ ПЕРЕБІГОМ ХВОРОБИ

В основі патогенезу дифузного токсичного зобу (ДТЗ) лежать аутоімунні механізми. Одним з важливих чинників, здатних призводити до формування таких порушень при ДТЗ, може бути патологічна дія ендотоксину (ЕТ) грамнегативної флори кишечника. В зв'язку з цим метою даної роботи був аналіз особливостей клітинного антиендотоксического імунітету у хворих ДТЗ з рецидивуючим перебігом хвороби. Доведена дисфункція клітинного антиендотоксического імунітету у хворих на ДТЗ з рецидивуючим перебігом, яка може призводити до проявів патофізіологічної дії ЕТ та потенціювати аутоімунні механізми патогенезу.

Ключевые слова: диффузный токсический зоб, рецидив, эндотоксин, клеточный иммунитет.

SUMMARY

CELLULAR ANTIENDOTOXIN IMMUNITY IN GRAVES' DISEASE PATIENTS WITH RELAPSING COURSE OF THE DISEASE

The basis of Graves' disease pathogenesis is autoimmune mechanisms. One of the most important factors, leading to the impairments in Graves' disease, may be pathological effect of endotoxin of the gram-negative flora of intestines. Due to this data the aim of this work was analysis features of cellular antiendotoxin immunity in the patients with relapsing course of Graves' disease. It was prove the dysfunction of cellular antiendotoxin immunity in patients with relapsing course of Graves' disease which may result in pathological endotoxin action and exponentiate autoimmune mechanisms.