

УДК 616.441-002-006.327-018.72:577.115.4:575.1

**М.І. Шеремет, Л.П. Сидорчук,
Я.В. Гирла, В.О. Шідловський*,
А.Д. Беденюк* Г.С. Курочкин**,
А.В. Левицький****

ВДНЗ України "Буковинський
державний медичний університет",
Чернівці

* ВДНЗ України "Тернопільський
державний медичний університет ім. І.Я.
Горбачевського", Тернопіль

** Державний Університет Медицини та
Фармації ім. М.Тестеміцану,
Кишинів, Молдова

АСОЦІАЦІЯ РІВНЯ ЦИТОКІНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА АПОПТОЗУ ЛІМФОЦИТІВ ІЗ ПОЛІМОРФНИМИ ВАРІАНТАМИ ГЕНІВ BCL-2 (RS17759659), CTLA-4 (RS231775) І APO- 1/FAS (RS2234767) У ПАЦІЄНТІВ НА ВУЗЛОВІ ФОРМИ ЗОБА НА ФОНІ АВТОІМУННОГО ТИРЕОЇДИТУ ТА АДЕНОМУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Ключові слова: вузловий зоб на
фоні автоімунного тиреоїдиту,
цитокіни, апоптоз, щитоподібна
залоза

Резюме. У статті наведено результати дослідження рівня цитокінів си-риватки крові та апоптозу лімфоцитів у хворих на ВЗАІТ та АЩЗ на основі визначення готовності клітин до апоптозу (вмісту лімфоцитів, що несуть маркер апоптозу - CD95+-рецептор), кількості апоптичних лімфоцитів (annexin V+лімфоцитів) та вмісту проапоптичних фактора некрозу пухлини - α (ФНП- α), IL-1 β та IL-6, а також протизапального IL-4 у сироватці крові з урахуванням поліморфізму генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) і APO-1/Fas (rs2234767). Отримані результати засвідчують, що в умовах пошкоджуючої дії продуктів пероксидації на структури ЩЗ, активації Fas- та каспазо-залежних механізмів впливу на про- та антиапоптичні мішені індукована гіперпродукція та вивільнення TNF- α з тиреоїдстимульованих лімфоцитів стимулює додатковий синтез інших прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-6, а також компенсаторно контрзапальних білків, у т.ч IL-4. Синхронно зростає секреція розчинної форми рецептора TNF- α (sTNFR), що перешкоджає зв'язуванню відповідного цитокіна зі специфічним мембранним шеддінг ряду рецепторів і роз'єднує апоптичні сигнали. Вищезначені зміни найбільш комплексно асоціюють із поліморфними варіантами генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) і тільки за окремими показниками майже утричі слабше із Fas (rs2234767). Скорочення: ВЗАІТ - вузловий зоб на фоні автоімунного тиреоїдиту, ЩЗ - щитоподібна залоза, АЩЗ - аденома щитоподібної залози.

Вступ

Захворюваність на автоімунний тиреоїдит (АІТ) з кожним роком зростає і в подальшому очікується збереження тенденції зростання [1-5]. Механізми, що лежать в основі порушення регуляції системи імунітету при автоімунній патології, у т.ч за АІТ, є актуальними і потребують подальшого вивчення.

Окрім того, дослідженнями останніх років доведено, що генетичні мутації, особливо регуляторних генів, спричиняють розвиток тиреопатій, у тому числі й ВЗАІТ [6-7].

Перспективним напрямком даного дослідження є імунозалежний апоптоз клітин ЩЗ [8-10]. Механізми пригнічення та активації імунітету по-

в'язані із модуляцією апоптозу клітин імунної системи у т.ч. через ефекторні молекули цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD95+-лімфоцити), CD95 антиген (також відомий як Fas/Apo-1) і Fas ліганд, каскад цитокінових реакцій тощо. Ключовими медіаторами запуску запалення, у т.ч за АІТ, є доімунні та імунні цитокіни: TNF- α , IL-1 β та IL-6, IL-4, IL-8 та ін. відповідно [11]. При цьому один і той самий цитокін може зумовити різноспрямовану дію (стимулювати чи лімітувати проліферацію, диференціювання, міграцію та ефекторну функцію імунокомпетентних клітин), що залежить від його концентрації, типу специфічного рецептора на клітині та стану її активації [12]. Відомо, що TNF- α продукується макрофага-

ми, а також активованими Т-лімфоцитами ЦЗ і Т-клітинами, які знаходяться в стані "спокою". TNF- α підвищує цитотоксичну активність лімфоцитів, які інфільтрують ЦЗ, а також бере участь у процесах їх апоптозопосередкованої загибелі, тобто, певною мірою, є компонентом не тільки пошкоджуючої, але і захисної реакції макроорганізму, що контролює "силу" автоімунного процесу [13, 14]. Механізми зворотного контролю проявів реакції запалення пов'язані з продукцією протизапальних інтерлейкінів (IL-4, IL-10, IL-13) і розчинних інгібіторів прозапальних цитокінів, які чинять імуносупресивну дію.

В Україні дослідження рівня цитокінів периферичної крові та апоптозу лімфоцитів, які асоціюють із поліморфізмом генів (Bcl-2, Fas (APO-1), CTLA-4) у пацієнтів на ВЗАІТ та АЦЗ на момент початку даного дослідження не проводилось.

Мета дослідження

Вивчення рівня цитокінів периферичної крові та апоптозу лімфоцитів у хворих на ВЗАІТ та АЦЗ на основі визначення готовності клітин до апоптозу (вмісту лімфоцитів, що несуть маркер апоптозу - CD95+ - рецептор), кількості апоптичних лімфоцитів (annexin V+лімфоцитів) та вмісту проапоптичних фактора некрозу пухлини - α (ФНП- α), IL-1 β та IL-6, а також протизапального IL-4 у сироватці крові з урахуванням поліморфізму генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) і APO-1/Fas (rs2234767).

Матеріали та методи дослідження

Упродовж 2013 по 2016 рр., на базі Чернівецької обласної клінічної лікарні, обстежили 125 жінок з ВЗАІТ. Вік пацієнтів коливався від 23 до 72 років. Діагноз був виставлений клінічно, лабораторно (антитіла до тиреопероксидази (АТПО) - 60-250 ОД/мл; антитіла до тиреоглобуліну (АТТГ) - 60-500 ОД/мл; тиреотропний гормон (ТТГ) - 4-10 мОД/л) за допомогою УЗД та підтверджений гістологічно після хірургічного лікування.

Нами виділена група з 30 жінок, у яких за даними УЗД, тонкогілкової аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ) та гістологічного заключення після операції діагностовано аденому ЦЗ. Ми виділили цю групу в зв'язку з тим, що ця патологія є однією з найбільш розповсюджених серед вузлових форм зоба. Обстежували також 25 практично здорових донорів.

Матеріалом для дослідження слугувала периферична кров, забрана з ліктьової вени вранці натщесерце в кількості 10 мл.

Виділення лімфоцитів здійснювали методом центрифугування на градієнті щільності фіколуурографіну 1,077г/см³. Визначення вмісту лімфоцитів, що несуть маркер апоптозу - CD95+ рецептор, проводилося в екстракорпоральних умовах з використанням моноклональних антитіл CD95 (Caltag, Австрія) в лімфоцитотоксичному тесті. Рівень апоптозу в популяції лімфоцитів периферичної крові визначали шляхом встановлення експресії на зовнішньому моношарі плазматичної мембрани молекул фосфатидилсерину методом флуоресцентної мікроскопії з використанням FITC-міченого аннексину V+ за допомогою набору Аннексин V+ FITC ("Beckman Coulter", Франція).

Для дослідження концентрації фактора некрозу пухлини (TNF- α) застосовували метод проточної цитометрії і симплексні набори фірми Bender Medsystems GmbH (Австрія) з використанням технології "Multiplex", що дозволяє в одному зразку визначати необхідну кількість цитокіну.

Виділення ДНК проводили набором реактивів Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit (#K0721, Thermo Fisher Scientific), згідно з інструкцією із застосування, з інкубацією з протеїназою К протягом ночі для повного лізису клітин. Очищену ДНК розбавили в Elution Buffer і провели оцінку якості на спектрофотометрі Nanodrop2000C. Тільки проби з концентрацією не нижче 15 нг/мкл і значеннями співвідношення A(260/280) між 1,7 і 2,0 використані для генотипування. Отримані екстракти розділені на аліквоти,

Таблиця 1

Нуклеотидна послідовність регіону, що включає аналізований поліморфізм

Референсний номер SNP ID	Номер тесту (Assay ID*)	Фрагмент регіону, що включає аналізований поліморфізм
rs231775 (CTLA4)	C__2415786_20	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
rs17759659 (BCL2)	C__33628167_10	TCTTCTACCAAAGATTACACAATAC[A/G]GTGTTGATGGGAACGTGACCTAGTT
rs2234767 (FAS)	C__12123966_10	CAGAGTGTGTGCACAAGGCTGGCAC[A/G]CCCAGGGTCTTCCTCATGGCACTAA

Примітка: згідно з сайтом www.thermofisher.com.

одна з яких поміщена в холодильник при 4°C до моменту використання, а інші заморожені при -20°C.

Для нормалізації кількості ДНК усі проби були приведені до концентрації 2 нг/мкл з використанням Nuclease-free water.

Для генотипування вибраних точкових поліморфізмів застосували техніку TaqMan. Вивчаються поліморфізм, позначені референсним номером SNP ID, згідно з базою даних dbSNP. Для

тестування кожного з поліморфізмів використовували TaqMan® SN Genotyping Assays (40X) (4351379, Thermo Fisher Scientific) (табл. 1).

Об'єм реакційної суміші становив 5 мкл і складався з: 2,5 мкл реактиву TaqMan Genotyping MasterMix (20X) (4371355, Thermo Fisher Scientific), 0,25 мкл розчину зондів і 2,25 мкл розчину ДНК. Генотипування проводилося на інструменті Quant Studio 6 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 384-лунковий блок.

Ампліфікацію проводили при умовах:

Активация	10 хв	95°C	
Денатурація	15 сек	92°C	40*/60**
Відпал/ елонгація	1 хв	60°C	циклов

Примітка: * - для ампліфікації поліморфізмів асоційованих з генами CTLA-4 і Fas; ** - для ампліфікації поліморфізмів асоційованих з генами Bcl-2.

Для збору даних та аналізу використовувалась програма QuantStudio™ Real-Time PCR (v.1.3).

Основну частину статистичного аналізу проведено з використанням програми "Statistica 7.0" (SPSS). Номінальні дані подані у вигляді кількісних та відсоткових значень. Відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді - Вайнберга перевіряли за допомогою Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували 2-критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах з різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вплив чинників на розвиток патології ЦЗ оцінювали за допомогою моделі бінарної логістичної регресії за величиною відносного ризику (RelR), відношенням ризиків (RR) і відношенням шансів (OR) з 95 % довірчим інтервалом [95 % CI] з урахуванням критерію 2 (df = 1). Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що рівень лімфоцитів, що презентують маркер апоптозу - CD95+-рецептор (табл. 2), переважав вірогідно у гомозиготних носіїв мінорного G-алеля гена BCL-2 (rs17759659) над таким у осіб із AA- і AG-генотипами на 27,09% (pAA=0,034) і 14,0% (pAG=0,002). Середнє значення апоптичної активності лімфоцитів за кількістю серед них annexin V+-презентуючих клітин у хворих на патологію ЦЗ, навпаки, вагомо нижче, ніж у осіб контрольної групи на 35,06-44,46% (p≤0,045) без вірогідної залежності від генотипів гена BCL-2 (rs17759659). Останнє, на тлі високого вмісту CD95+, засвідчує порушення реалізації рецептор-залежного апоптозу лімфоцитів.

Причиною такого стану може бути посилений синтез розчинної форми Fas-рецептора (soluble Fas - sFAS), який накопичується у мікрооточенні лімфоцитів і конкурувати з мембрано-локалізованим рецептором у зв'язуванні ліганди. Є відомості [11], що sFas пригнічує рецептор-опосередкований апоптоз і елімінацію активованих лімфоцитів, а також сприяє формуванню автоагресивних клонів клітин та прогресуванню автоімунного процесу. За даних умов у наших хворих вміст TNF-а та IL-1α, як найбільш апоптогенних цитокінів, а також прозапального IL-6 істотно перевищували показники контролю у 2,89-4,37 рази (p≤0,006), 3,31-4,91 рази (p≤0,008) і 1,79-2,17 рази (p<0,001) відповідно. Чіткої залежності вище означених змін з урахуванням поліморфізму гена BCL-2 (rs17759659) не встановили. Натомість вміст протизапального IL-4 навпаки був дещо меншим у хворих, ніж у контролі, але вірогідно тільки у носіїв GG-генотипу гена BCL-2 - на 15,14% (p=0,038).

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію поліморфного сайту гена BCL-2 (rs17759659) із показниками "готовності" до апоптозу лімфоцитів - кількістю CD95+-рецепторів (F=28,36, p<0,001), дещо менше із апоптичною активністю лімфоцитів за кількістю annexin V+-лімфоцитів (F=4,17, p=0,018), а також цитокінами: TNF-а (F=47,47, p<0,001), IL-1β (F=16,13, p<0,001), IL-6 (F=23,62, p<0,001) та IL-4 (F=9,19, p<0,001) (табл. 2).

Серед хворих на патологію ЦЗ переважали такі із високим рівнем (>50 перцентиль) CD95+ лімфоцитів і TNF-а на 16,8% (p=0,008), на тлі помірного (≤50 перцентиль) підвищення вмісту у сироватці IL-1β - на 58,4% (p<0,001) і IL-6 - на 56,8% (p<0,001) та незначного зростання (≤25 перцентиль) IL-4 - на 10,4% (p>0,05), за низької кон-

Таблиця 2

Рівень показників апоптозу лімфоцитів та цитокінів сироватки крові з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (rs17759659)

Показники	Контроль, n=25	Генотипи гена <i>BCL-2</i> у хворих		
		AA, n=10	AG, n=110	GG, n=5
CD95 ⁺ лімфоцити, %	11,39±0,65	15,06±0,91 p=0,011	16,79±1,02 p=0,004	19,14±0,77 p<0,001 p _{AA} =0,034 p _{AG} =0,002
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	17,77±0,38	11,54±1,06 p=0,045	10,64±1,15 p=0,02	9,87±1,06 p=0,013
TNF-α, пг/мл	1,95±0,13	8,52±1,0 p=0,001	5,64±0,98 p=0,006 p _{AA} =0,028	7,71±1,08 p=0,002
IL-1β, пг/мл	1,93±0,13	7,48±1,21 p=0,003	6,38±1,30 p=0,008	9,47±1,39 p=0,008
IL-4, пг/мл	1,85±0,08	1,83±0,13	1,73±0,11	1,57±0,10 p=0,038
IL-6, пг/мл	2,79±0,08	5,68±0,41 p<0,001	5,0±0,44 p<0,001	6,06±0,45 p<0,001

Примітка. p – вірогідність різниць показників із групою контролю; p_{AA} – вірогідність різниць показників із носіями AA-генотипу; p_{AG} – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу

центрації annexin V⁺-лімфоцитів (>50 центиль) - на 16,8% (p=0,008), переважно у пацієнтів із G-алелем гена *BCL-2* (rs17759659) (особи із AG- і GG-генотипами): на 18,23% (p=0,006), 61,74% (p<0,001) і 60,0% (p<0,001) відповідно, за IL-4 - на 11,30% (p=0,057), і за annexin V⁺-лімфоцитами - на 18,23% (p=0,006) (табл. 3).

Вміст у сироватці лімфоцитів із CD95⁺-рецепторами, TNF-α та IL-1β переважали у власників основного A-алеля гена *CTLA-4* (rs231775) (табл. 4) над такими у хворих із GG-генотипом та осіб контрольної групи: за CD95⁺-лімфоцитами - на 36,08% (p_{AA}=0,01) і 37,14% (p_{AG}=0,011), за TNF-α - у 2,14 (p_{AA}=0,015) і 2,07 рази (p_{AG}=0,012), за IL-1β - у 2,20 (p_{AA}=0,017) і 2,07 рази (p_{AG}=0,018) відповідно. Апоптична активність лімфоцитів за кількістю annexin V⁺-презентуючих клітин, навпаки, суттєво менша у носіїв дикого A-алеля гена *CTLA-4* (rs231775), ніж у хворих із GG-генотипом та осіб контрольної групи на 32,40% (p_{AA}=0,017) і 36,56% (p_{AG}=0,018) відповідно. Рівень IL-6 переважав у сироватці крові хворих на патологію ШЗ, однак без вірогідних залежностей з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (rs231775) (табл. 4).

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію поліморфного сайту гена *CTLA-4* (rs231775) із показниками "готовності" до апоптозу лімфоцитів - кількістю клітин із CD95⁺-рецепторами (F=24,28, p<0,001), дещо сильніше із апоптичною активністю лімфоцитів за кількістю annexin V⁺-лімфоцитів (F=51,24, p<0,001), а також прозапальними цитокінами: TNF-α (F=21,29,

p<0,001), IL-1β (F=15,28, p<0,001) та IL-6 (F=22,44, p<0,001) (табл.4).

Якісний аналіз вище зазначених змін показників з урахуванням генотипів гена *CTLA-4* (rs231775) засвідчив (табл. 5), що серед хворих на патологію ШЗ переважали такі із високим рівнем (>50 центиль) CD95⁺ лімфоцитів і TNF-α на 15,70% (χ²=5,97; p=0,014), помірним (≤50 центиль) підвищенням вмісту у сироватці IL-1β - на 60,32% (p<0,001) і IL-6 - на 58,68% (p<0,001) та незначним зростанням (≤25 центиль) IL-4 - на 10,74% (p>0,05) із низькою концентрацією annexin V⁺-лімфоцитів (>50 центиль) - на 15,70% (χ²=5,97; p=0,014), переважно у пацієнтів із основним A-алелем гена *CTLA-4* (rs231775).

Рівень аналізованих показників апоптозу і цитокінового профілю у сироватці хворих не мали залежності від поліморфних варіантів гена *Fas* (rs2234767) і відповідали загальній тенденції в обстеженій популяції (табл. 6): у хворих вміст CD95⁺-лімфоцитів, TNF-α, IL-1β та IL-6 переважали над такими у осіб контрольної групи - на 44,16% (p=0,006) і 47,94% (p=0,004), за TNF-α - у 2,85 (p=0,005) і 3,07 рази (p=0,004), за IL-1β - у 3,54 і 3,08 рази (p=0,008), за IL-6 - у 1,75 (p=0,003) і 1,85 (p=0,002) відповідно; кількість annexin V⁺-лімфоцитів, навпаки, суттєво менша, ніж у контролі - на 37,08% (p=0,001) і 40,52% (p<0,001) відповідно.

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію поліморфного сайту гена *Fas* (rs2234767) тільки із апоптичною активністю

Таблиця 3

Показники апоптозу лімфоцитів периферійної крові та рівень цитокінів сироватки крові у хворих на патологію щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (rs17759659)

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>BCL-2</i> , n=125 (%)		
		AA, n=10	AG, n=110	GG, n=5
CD95 ⁺ лімфоцити, %	Помірне підвищення (≤ 50 процентиль), n=52	5 (50,0)	46 (41,82)	1 (20,0)
	Високе підвищення (>50 процентиль), n=73	5 (50,0)	64 (58,18)	4 (80,0)
χ^2 ; p		p>0,05	$\chi^2=5,89$ p=0,015	p>0,05
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	Помірне зменшення (≤ 50 процентиль), n=52	5 (50,0)	46 (41,82)	1 (20,0)
	Сильне зменшення (>50 процентиль), n=73	5 (50,0)	64 (58,18)	4 (80,0)
χ^2 ; p		p>0,05	$\chi^2=5,89$ p=0,015	p>0,05
TNF-а, пг/мл	Помірне зменшення (≤ 50 процентиль), n=32	1 (10,0)	31 (28,18)	0
	Помірне підвищення (?50 процентиль), n=20	4 (40,0)	15 (13,64)	1 (20,0)
	Високе підвищення (>50 процентиль), n=73	5 (50,0)	64 (58,18)	4 (80,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=3,90$ p>0,05	$\chi^2=51,08$ p<0,001	p>0,05
IL-1 β , пг/мл	Помірне підвищення (≤ 50 процентиль), n=99	6 (60,0)	90 (81,82)	3 (60,0)
	Високе підвищення (>50 процентиль), n=26	4 (40,0)	20 (18,18)	2 (40,0)
χ^2 ; p		$\chi^2<1,0$ p>0,05	$\chi^2=89,09$ p<0,001	p>0,05
IL-4, пг/мл	Підвищення до 25 процентиль, n=69	5 (50,0)	62 (56,36)	2 (40,0)
	Норма, n=31	1 (10,0)	29 (26,36)	1 (20,0)
	Сильне зменшення (>50 процентиль), n=25	4 (40,0)	19 (17,27)	2 (40,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=3,90$ p>0,05	$\chi^2=41,23$ p<0,001	$\chi^2<1,0$ p>0,05
IL-6, пг/мл	Помірне підвищення (≤ 50 процентиль), n=98	6 (60,0)	89 (80,91)	3 (60,0)
	Високе підвищення (>50 процентиль), n=27	4 (40,0)	21 (19,09)	2 (40,0)
χ^2 ; p		$\chi^2<1,0$ p>0,05	$\chi^2=84,07$ p<0,001	-

лімфоцитів за кількістю annexin V⁺-лімфоцитів (F=8,79, p=0,004), а також прозапальними цитокінами: TNF- α (F=4,12, p=0,045), IL-1 β (F=10,48, p=0,002) та IL-6 (F=7,17, p=0,008) (табл. 6).

Вірогідно частіше реєстрували серед гомозиготних носіїв дикого G-алеля гена *Fas* (rs2234767) осіб із високим вмістом (>50 процентиль) CD95⁺-лімфоцитів, низьким рівнем annexin V⁺-лімфоцитів (>50 процентиль) та незначним підвищенням у сироватці (≤ 25 процентиль) IL-4 - на 15,68% (p<0,05) (табл.7). Також частіше виявляли осіб із високим рівнем TNF- α (на 39,13%;

p=0,003 і 15,68%; p<0,001), помірним підвищенням IL-1 β та IL-6 (на 65,22%, 56,86% і 54,90%; p<0,001 відповідно), що однак не мало залежності від поліморфних варіантів гена *Fas* (rs2234767).

Ризик АІТ та АЦЗ в обстеженій популяції зростає за вагомого збільшення у сироватці CD95⁺-лімфоцитів і TNF- α (>50 процентиль) та зниження annexin V⁺-лімфоцитів (>50 процентиль) - у 1,45 раза (OR=2,09; 95% CI OR: 1,24-2,52; p=0,006), а також за помірного підвищення IL-1 β у сироватці - у 4,23 раза (OR=17,87; 95% CI OR: 9,26-34,48; p<0,001), але тільки у носіїв мінорного

Таблиця 4

Рівень показників апоптозу лімфоцитів та цитокінів сироватки крові з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (rs231775)

Показники	Контроль, n=25	Генотипи гена <i>CTLA-4</i> у хворих		
		AA, n=59	AG, n=62	GG, n=4
CD95 ⁺ лімфоцити, %	11,39±0,65	16,82±1,28 p=0,006	16,95±1,31 p=0,006	12,36±0,55 p _{AA} =0,01 p _{AG} =0,011
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	17,77±0,38	10,89±1,21 p=0,002	10,22±1,05 p<0,001	16,11±1,49 p _{AA} =0,009 p _{AG} =0,01
TNF-а, пг/мл	1,95±0,13	5,98±1,02 p=0,005	5,78±0,88 p=0,004	2,79±0,74 p _{AA} =0,015 p _{AG} =0,012
IL-1β, пг/мл	1,93±0,13	6,83±1,40 p=0,008	6,44±1,25 p=0,007	3,11±0,55 p=0,046 p _{AA} =0,017 p _{AG} =0,018
IL-4, пг/мл	1,85±0,08	1,71±0,12	1,72±0,11	1,80±0,10
IL-6, пг/мл	2,79±0,08	5,12±0,48 p=0,003	5,07±0,43 p=0,002	3,56±0,34 p=0,037

Примітка. p – вірогідність різниць показників із групою контролю; p_{AA} – вірогідність різниць показників із носіями AA-генотипу; p_{AG} – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу.

Таблиця 5

Показники апоптозу лімфоцитів периферійної крові та рівень цитокінів сироватки крові у хворих на патологію щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (rs231775)

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>CTLA-4</i> , n=125 (%)		
		AA, n=59	AG, n=62	GG, n=4
CD95 ⁺ лімфоцити, %	Помірне підвищення (\leq 50 процентиля), n=52	23 (38,98)	28 (45,16)	1 (25,0)
	Високе підвищення (>50 процентиля), n=73	36 (61,02)	34 (54,84)	3 (75,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=5,73$ p=0,017	$\chi^2=1,16$ p>0,05	p>0,05
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	Помірне зменшення (\leq 50 процентиля), n=52	23 (38,98)	28 (45,16)	1 (25,0)
	Сильне зменшення (>50 процентиля), n=73	36 (61,02)	34 (54,84)	3 (75,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=5,73$ p=0,017	$\chi^2=1,16$ p>0,05	p>0,05
TNF-а, пг/мл	Помірне зменшення (\leq 50 процентиля), n=32	14 (23,73)	18 (29,03)	0
	Помірне підвищення (\leq 50 процентиля), n=20	9 (15,25)	10 (16,13)	1 (25,0)
	Високе підвищення (>50 процентиля), n=73	36 (61,02)	34 (54,84)	3 (75,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=31,45$ p<0,001	$\chi^2=21,68$ p<0,001	p>0,05
IL-1β, пг/мл	Помірне підвищення (\leq 50 процентиля), n=99	45 (76,27)	52 (83,87)	2 (50,0)
	Високе підвищення (>50 процентиля), n=26	14 (23,73)	10 (16,13)	2 (50,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=32,58$ p<0,001	$\chi^2=56,90$ p<0,001	p>0,05

Продовження таблиці 5

IL-4, пг/мл	Підвищення до 25 перцентиль, n=69	37 (62,71)	30 (48,39)	2 (50,0)
	Норма, n=30	8 (13,56)	22 (35,48)	0
	Сильне зменшення (>50 перцентиль), n=26	14 (23,73)	10 (16,13)	2 (50,0)
χ^2 ; p		$\chi^2=35,75$ p<0,001	$\chi^2=14,71$ p<0,001	p>0,05
IL-6, пг/мл	Помірне підвищення (≤ 50 перцентиль), n=98	45 (76,27)	51 (82,26)	2 (50,0)
	Високе підвищення (>50 перцентиль), n=27	14 (23,73)	11 (17,74)	2 (50,0)
	χ^2 ; p	$\chi^2=32,58$ p<0,001	$\chi^2=51,61$ p<0,001	p>0,05

Таблиця 6

Рівень показників апоптозу лімфоцитів та цитокінів сироватки крові з урахуванням поліморфних варіантів гена APO-1/Fas (rs2234767)

Показники	Контроль, n=25	Генотипи гена <i>Fas</i> у хворих	
		AG, n=23	GG, n=102
CD95 ⁺ лімфоцити, %	11,39±0,65	16,42±1,11 p=0,006	16,85±1,07 p=0,004
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	17,77±0,38	11,18±1,06 p=0,001	10,57±0,85 p<0,001
TNF-а, пг/мл	1,95±0,13	5,55±0,89 p=0,005	5,99±0,95 p=0,004
IL-1 β , пг/мл	1,93±0,13	6,84±1,39 p=0,008	5,94±1,16 p=0,008
IL-4, пг/мл	1,85±0,08	1,71±0,09	1,74±0,08
IL-6, пг/мл	2,79±0,08	4,87±0,42 p=0,003	5,15±0,46 p=0,002

Примітка. p – вірогідність різниць показників із групою контролю; pAG – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу.

G-алеля гена BCL-2 (rs17759659) (табл. 8). Натомість ймовірність появи патології ШЗ зменшується за низького вмісту протизапального цитокіну IL-4 (OR=0,05; 95%CI OR=0,03-0,10; p<0,001) та високого рівня IL-6 (>50 перцентиль) (OR=0,06; 95%CI OR=0,03-0,12; p<0,001).

Збільшення у сироватці CD95⁺-лімфоцитів і TNF-а (>50 перцентиль) та зниження annexin V⁺-лімфоцитів (>50 перцентиль) підвищує ризик АІТ та АЦЗ в обстеженій популяції у 1,56 разу (OR=2,45; 95% CI OR: 1,17-5,13; p=0,017), але тільки у гомозиготних носіїв основного А-алеля (AA-генотип) гена CTLA-4 (rs231775) (табл. 9). Помірне зростання IL-1 β у сироватці також підвищує даний ризик у 6,35 разу (OR=23,57; 95% CI OR: 6,13-90,67; p<0,001), а незначна елевация IL-4 (≤ 25 перцентиль) - у 5,23 разу (OR=12,33; 95% CI OR: 3,31-46,01; p<0,001), однак знову ж тільки у носіїв AA-генотипу гена CTLA-4 (rs231775). Найнижча ймовірність появи патології

ШЗ в обстеженій популяції у власників G-алеля вище означеного гена за низького вмісту протизапального цитокіну IL-4 (OR=0,03; 95%CI OR=0,01-0,12; p<0,001) та високого рівня IL-6 (>50 перцентиль) (OR=0,03; 95%CI OR=0,01-0,13; p<0,001) (табл. 9).

Ризик АІТ та АЦЗ у обстеженій популяції зростає за вагомого збільшення у сироватці CD95⁺-лімфоцитів і TNF-а (>50 перцентиль) та зниження annexin V⁺-лімфоцитів (>50 перцентиль) - у 1,37 разу (OR=1,88; 95% CI OR: 1,08-3,28; p=0,018), але тільки у гомозиготних носіїв дикого G-алеля (GG-генотип) гена Fas (rs2234767) (табл. 10).

Таким чином, отримані результати засвідчують, що в умовах пошкоджуючої дії продуктів пероксидації на структури ШЗ, активації Fas- та каспазо-залежних механізмів впливу на про- та антиапоптичні мішені індукована гіперпродукція та вивільнення TNF- α з тиреоїдстимульованих лімфоцитів стимулює додатковий синтез інших

Таблиця 7

Показники апоптозу лімфоцитів периферійної крові та рівень цитокінів сироватки у хворих на патологію щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена APO-1/Fas (rs2234767)

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>Fas</i> , n=125 (%)	
		AG, n=23	GG, n=102
CD95 ⁺ лімфоцити, %	Помірне підвищення (\leq 50 перцентиль), n=52	9 (39,13)	43 (42,16)
	Високе підвищення (>50 перцентиль), n=73	14 (60,87)	59 (57,84)
χ^2 ; p		$\chi^2=2,17$ p>0,05	$\chi^2=5,02$ p=0,025
Annexin V ⁺ лімфоцити, у.о.	Помірне зменшення (\leq 50 перцентиль), n=52	9 (39,13)	43 (42,16)
	Сильне зменшення (>50 перцентиль), n=73	14 (60,87)	59 (57,84)
χ^2 ; p		$\chi^2=2,17$ p>0,05	$\chi^2=5,02$ p=0,025
TNF-а, пг/мл	Помірне зменшення (\leq 50 перцентиль), n=32	5 (21,74)	27 (26,47)
	Помірне підвищення (\leq 50 перцентиль), n=20	4 (17,39)	16 (15,69)
	Високе підвищення (>50 перцентиль), n=73	14 (60,87)	59 (57,84)
χ^2 ; p		$\chi^2=11,88$ p=0,003	$\chi^2=44,02$ p<0,001
IL-1 β , пг/мл	Помірне підвищення (\leq 50 перцентиль), n=99	19 (82,61)	80 (78,43)
	Високе підвищення (>50 перцентиль), n=26	4 (17,39)	22 (21,57)
χ^2 ; p		$\chi^2=19,57$ p<0,001	$\chi^2=65,96$ p<0,001
IL-4, пг/мл	Підвищення до 25 перцентиль, n=69	10 (43,48)	59 (57,84)
	Норма, n=30	9 (39,13)	21 (20,59)
	Сильне зменшення (>50 перцентиль), n=26	4 (17,39)	22 (21,57)
χ^2 ; p		$\chi^2=4,04$ p>0,05	$\chi^2=41,38$ p<0,001
IL-6, пг/мл	Помірне підвищення (\leq 50 перцентиль), n=98	19 (82,61)	79 (77,45)
	Високе підвищення (>50 перцентиль), n=27	4 (17,39)	23 (22,55)
χ^2 ; p		$\chi^2=19,57$ p<0,001	$\chi^2=61,49$ p<0,001

Таблиця 8

Поліморфні варіанти гена BCL-2 (rs17759659) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу та неспецифічного запалення

Генотипи гена <i>BCL-2</i>	RelR	OR	95%CI RR	95%CI OR	p	
Збільшення кількості CD95 ⁺ лімфоцитів (>50 перцентиль)	AA	0,71	0,69	0,22-2,34	0,19-2,52	>0,05
	AG, GG	1,45	2,09	1,11-1,89	1,24-3,54	0,006
Зменшення кількості Annexin V ⁺ лімфоцитів (>50 перцентиль)	AA	0,71	0,69	0,22-2,34	0,19-2,52	>0,05
	AG, GG	1,45	2,09	1,11-1,89	1,24-3,54	0,006
Підвищення TNF-а (>50 перцентиль)	AA	0,71	0,69	0,22-2,34	0,19-2,52	>0,05
	AG, GG	1,45	2,09	1,11-1,89	1,24-3,54	0,006
Високе підвищення IL-1 β (>50 перцентиль)	AA	0,67	0,44	0,27-1,66	0,07-2,66	>0,05
	AG, GG	0,24	0,06	0,16-0,35	0,03-0,11	<0,001

Продовження таблиці 8

Помірне підвищення ІЛ-1 β (≤ 50 перцентиль)	AA	1,50	2,25	0,60-3,73	0,38-13,47	>0,05
	AG,GG	4,23	17,87	2,87-6,22	9,26-34,48	<0,001
Зменшення ІЛ-4 (>50 перцентиль)	AA	0,67	0,44	0,27-1,66	0,07-2,66	>0,05
	AG,GG	0,22	0,05	0,15-0,33	0,03-0,10	<0,001
Підвищення ІЛ-4 (≤ 25 перцентиль)	AA	0,71	0,69	0,22-2,34	0,19-2,52	>0,05
	AG,GG	1,25	1,57	0,97-1,63	0,94-2,65	0,057
Збільшення ІЛ-6 (>50 перцентиль)	AA	0,67	0,44	0,27-1,66	0,07-2,66	>0,05
	AG,GG	0,25	0,06	0,17-0,36	0,03-0,12	<0,001

Примітка. *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR*, *OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

Таблиця 9

Поліморфні варіанти гена *CTLA-4* (rs231775) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу та неспецифічного запалення

Генотипи гена <i>CTLA-4</i>	<i>RelR</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI RR</i>	<i>95%CI OR</i>	p	
Збільшення кількості CD95 ⁺ -лімфоцитів (>50 перцентиль)	AA	1,56	2,45	1,07-2,29	1,17-5,13	0,017
	AG,GG	1,28	1,63	0,90-1,80	0,82-3,24	>0,05
Зменшення кількості Annexin V ⁺ -лімфоцитів (>50 перцентиль)	AA	1,56	2,45	1,07-2,29	1,17-5,13	0,017
	AG,GG	1,28	1,63	0,90-1,80	0,82-3,24	>0,05
Підвищення TNF-а (>50 перцентиль)	AA	1,56	2,45	1,07-2,29	1,17-5,13	0,017
	AG,GG	1,28	1,63	0,90-1,80	0,82-3,24	>0,05
Високе підвищення ІЛ-1 β (>50 перцентиль)	AA	1,98	2,28	0,62-6,28	0,59-8,78	>0,05
	AG,GG	0,21	0,03	0,12-0,35	0,01-0,12	<0,001
Помірне підвищення ІЛ-1 β (?50 перцентиль)	AA	6,35	23,57	2,18-18,55	6,13-90,67	<0,001
	AG,GG	0,93	0,61	0,77-1,12	0,16-2,39	>0,05
Зменшення ІЛ-4 (>50 перцентиль)	AA	1,98	2,28	0,62-6,28	0,59-8,78	>0,05
	AG,GG	0,21	0,03	0,12-0,35	0,01-0,12	<0,001
Підвищення ІЛ-4 (?25 перцентиль)	AA	5,23	12,33	1,77-15,38	3,31-46,01	<0,001
	AG,GG	0,55	0,13	0,41-0,73	0,03-0,47	<0,001
Збільшення ІЛ-6 (>50 перцентиль)	AA	1,98	2,28	0,62-6,28	0,59-8,78	>0,05
	AG,GG	0,22	0,03	0,13-0,37	0,01-0,13	<0,001

Примітка. *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR*, *OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

Таблиця 10

Поліморфні варіанти гена *APO-1/Fas* (rs2234767) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу та неспецифічного

Генотипи гена <i>APO-1/Fas</i>	<i>RelR</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI RR</i>	<i>95%CI OR</i>	p	
Збільшення кількості CD95 ⁺ лімфоцитів (>50 перцентиль)	AG	1,05	1,13	0,73-1,52	0,45-2,86	>0,05
	GG	1,37	1,88	1,04-1,88	1,08-3,28	0,018
Зменшення кількості Annexin V ⁺ лімфоцитів (>50 перцентиль)	AG	1,05	1,13	0,73-1,52	0,45-2,86	>0,05
	GG	1,37	1,88	1,04-1,88	1,08-3,28	0,018
Підвищення TNF-а (>50 перцентиль)	AG	1,05	1,13	0,73-1,52	0,45-2,86	>0,05
	GG	1,37	1,88	1,04-1,88	1,08-3,28	0,018
Високе підвищення ІЛ-1 β (>50 перцентиль)	AG	0,81	0,77	0,31-2,11	0,24-2,48	>0,05
	GG	1,24	1,31	0,47-3,25	0,40-4,24	>0,05
Помірне підвищення ІЛ-1 β (≤ 50 перцентиль)	AG	1,05	1,31	0,85-1,30	0,40-4,24	>0,05
	GG	0,95	0,77	0,77-1,15	0,24-2,48	>0,05
Зменшення ІЛ-4 (>50 перцентиль)	AG	0,81	0,77	0,31-2,11	0,24-2,48	>0,05
	GG	1,24	1,31	0,47-3,25	0,40-4,24	>0,05
Підвищення ІЛ-4 (≤ 25 перцентиль)	AG	0,75	0,56	0,46-1,23	0,22-1,40	>0,05
	GG	1,33	1,78	0,81-2,18	0,72-4,45	>0,05

Продовження таблиці 10

Збільшення IL-6 (>50 процентиль)	AG	0,81	0,77	0,31-2,11	0,24-2,48	>0,05
	GG	1,30	1,38	0,50-3,39	0,43-4,47	>0,05

Примітка. *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR, OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-6, а також компенсаторно контрзапальних білків у тч IL-4. Синхронно зростає секреція розчинної форми рецептора TNF- α (sTNFR), що перешкоджає зв'язуванню відповідного цитокіна зі специфічним мембранним шеддінг ряду рецептором і роз'єднує апоптичні сигнали.

Висновки

1. Порушення реалізації рецептор-залежного апоптозу лімфоцитів за АІТ та АЦЗ характеризується збільшенням вмісту лімфоцитів, що презентують маркер апоптозу - CD95+-рецептор і засвідчують готовність до кілінгу клітини, а також прозапальних цитокінів TNF- α , IL-1 β та IL-6 при одночасному зменшенні апоптичної активності лімфоцитів за кількістю annexin V+-презентуючих клітин у периферичній крові та протизапального IL-4. Вищезначені зміни найбільш комплексно асоціюють із поліморфними сайтами генів BCL-2 (rs17759659) ($F=28,36$, $p<0,001$), CTLA-4 (rs231775) ($F=24,28$, $p<0,001$) і тільки за окремими показниками, майже утричі слабше із Fas (rs2234767) ($F=8,79$, $p=0,004$).

2. Вміст у сироватці лімфоцитів із CD95+-рецепторами переважали у гомозиготних носіїв мінорного G-алеля гена BCL-2 (rs17759659) та власників основного A-алеля гена CTLA-4 (rs231775): на 14,0-27,09% ($p\leq 0,034$) і 36,08-37,14% ($p?0,011$) відповідно. Рівні найбільш апоптогенних цитокінів TNF- α та IL-1 β , а також IL-6 вище загалом у сироватці крові хворих на патологію ЩЗ (у 2,89-4,37 разів ($p\leq 0,006$), 3,31-4,91 разів ($p\leq 0,008$) і 1,75-2,17 разів ($p<0,001$) відповідно), однак без вірогідних односпрямованих залежностей від поліморфізму генів BCL-2 (rs17759659) і Fas (rs2234767). Натомість у носіїв дикого A-алеля гена CTLA-4 (rs231775) концентрація прозапальних TNF- α та IL-1 β вища у 2,07-2,14 разів ($p?0,015$) та у 2,07-2,20 разів ($p\leq 0,018$) відповідно, а апоптична активність за кількістю annexin V+-лімфоцитів навпаки менша на 32,40% ($p_{AA}=0,017$) і 36,56% ($p_{AG}=0,018$) відповідно. Необхідно зауважити, що саме поліморфний сайт гена CTLA-4 (rs231775), за даними однофакторного дисперсійного аналізу, підтвердив найвищу асоціацію із апоптичною активністю лімфоцитів ($F=51,24$, $p<0,001$).

3. Ризик АІТ та АЦЗ у обстеженій популяції

зростає за збільшення у сироватці CD95+-лімфоцитів і TNF- α (>50 процентиль) та зниження annexin V+-лімфоцитів (>50 процентиль): у носіїв мінорного G-алеля гена BCL-2 (rs17759659) - у 1,45 разів ($OR=2,09$; $95\% CI OR: 1,24-2,52$; $p=0,006$); у гомозиготних носіїв основного A-алеля (AA-генотип) гена CTLA-4 (rs231775) - у 1,56 разів ($OR=2,45$; $95\% CI OR: 1,17-5,13$; $p=0,017$); у гомозиготних носіїв дикого G-алеля (GG-генотип) гена Fas (rs2234767) - у 1,37 разів ($OR=1,88$; $95\% CI OR: 1,08-3,28$; $p=0,018$). Помірне зростання IL-1 β у сироватці також підвищує ризик появи АІТ та АЦЗ у популяції мешканців Північної Буковини у 6,35 разів ($OR=23,57$; $95\% CI OR: 6,13-90,67$; $p<0,001$), а незначна елевація IL-4 (≤ 25 процентиль) - у 5,23 разів ($OR=12,33$; $95\% CI OR: 3,31-46,01$; $p<0,001$), однак тільки у носіїв AA-генотипу гена CTLA-4 (rs231775). Натомість ймовірність появи патології ЩЗ зменшується за низького вмісту протизапального цитокіну IL-4 ($OR=0,03-0,05$; $95\% CI OR=0,01-0,12$; $p<0,001$) та високого рівня IL-6 (>50 процентиль) ($OR=0,03-0,06$; $95\% CI OR=0,01-0,13$; $p<0,001$) у носіїв мутаційних G-алеля гена BCL-2 та G-алеля гена CTLA-4 (rs231775) і не має залежності від поліморфних варіантів гена Fas (rs2234767).

Перспективи подальших досліджень

Виявлення конкретних патогенетичних факторів і механізмів порушення регуляції апоптозу імункомпетентних клітин крові (лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів) і тиреоцитів та асоціація цих змін із поліморфними варіантами генів Bcl-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) і APO-1/Fas (rs2234767) у пацієнтів на вузлові форми зоба на фоні аутоімунного тиреоїдиту та аденому щитоподібної залози дозволить визначити причини їх виникнення і отже, сформулювати патогенетично обґрунтовані методологічні підходи до корекції імунопатологічних змін, що становлять основу їх розвитку.

Література. 1. Калоева А.А., Боташева В.С., Эркенова Л. Д. Характер морфологических изменений при эндемическом зобе // *Фундаментальные исследования*. - 2015. - № 1 (Ч. 1). - С. 30-40. 2. Brix T.H., Hegedus L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease // *Clin Endocrinol (Oxf)*. - 2012. - V.76, №4. P. 457-464. 3. Бондаренко О.О., Шпонька И.С., Гриценко П.А. Использование онкомаркеров в морфологической диагностике эпителиальных опухолей щитовидной железы. // *Морфология*. - 2010. - Т. 3, N. 2 - С. 12-16. 4. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. //

Thyroid. 2010. - V. 20, N. 7. - P. 715-725. 5. Dong Y.H., Fu D.G. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge // Eur Rev Med Pharmacol Sci. - 2014. - V. 18, N. 23. - P. 3611-3618. 6. Tsyganenko O.S., Voroschuk R.S. Immunomorphological reaction in the thyroid tissue in patients with autoimmune thyroiditis in combination with nodular goiter // Arta Medica. Nicholae Anestiadi, Tenth Congress of the Association of Surgeons of Moldova, Chisinau. - 2007. - V. 4, N. 25. - P. 51-52. 7. Sheremet M.I., Sydorhuk L.P., Shidlovskiy V.O., Bedenyuk A.D. Research of prognostic markers of proliferation and apoptosis in patients with nodular goiters combined with autoimmune thyroiditis // Archives of the Balkan Medical Union. - 2016. - V. 51, N. 4. - P. 488-491. 8. Sheremet M.I., Sydorhuk L.P., Shidlovskiy V.O., Bedenyuk A.D. et al. New prognostic markers of nodular forms of goiter combined with autoimmune thyroiditis // Journal of Education, Health and Sport. - 2017, V. 7, N. 3. - P. 475-482. 9. Sheremet M.I., Shidlovskiy V.O., Sydorhuk L.P. Assessment of proliferation and apoptosis markers in patients with autoimmune thyroiditis // Journal of Education, Health and Sport. - 2016. - V. 6, N. 1. - P. 179-188. 10. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. British Medicine Bulletin. - 2011. - P. 39-51. 11. Pekary A.E., Levin S.R., Johnson D.G., Berg L., Hershman J.M. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na/K-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells // J. Interferon Cytokine Res. - 1997. - V. 17. - P. 185-195. 12. Недосекова Ю.В., Уразова О.И., Кравец Е.Б., Чайковский А.В. Роль апоптоза в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Бюллетень сибирской медицины. - 2009. - Т. 4, №2. - С. 64-71. 13. Phenekos C., Vryonidou A., Gritzapis A.D. et al. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2) // Neuroimmunomodulation. - 2004, N. 11. - P. 209-213. 14. Lydon A., Martyn J.A. Apoptosis in critical illness. // Int. Anesthesiol. Clin. 2003, N 41, 5-77.

**АССОЦИАЦИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ
СЫВОРОТКИ КРОВИ И АПОПТОЗА
ЛИМФОЦИТОВ С ПОЛИМОРФНЫМИ
ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ BCL-2 (RS17759659), CTLA-4
(RS231775) И APO-1/FAS (RS2234767) У ПАЦИЕНТОВ
С УЗЛОВЫМИ ФОРМАМИ ЗОБА НА ФОНЕ
АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА И АДЕНОМЫ
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*М.И. Шеремет, Л.П. Сидорчук, Я.В. Гырла,
В.А. Шидловський, А.Д. Беденюк, Г.С. Курочкин,
А.В. Левицкий*

Резюме. В статье приведены результаты исследования уровня цитокинов сыворотки крови и апоптоза лимфоцитов у больных УЗАИТ и АЦЗ на основе определения готовности клеток к апоптозу (содержания лимфоцитов, несущих маркер апоптоза - CD95 -рецептор), количества апоптических лимфоцитов (annexin V лимфоцитов) и содержания проапоптотических фактора некроза опухоли - α (ФНО- α), IL-1 β и IL-6, а также противовоспалительного IL-4 в сыворотке крови с учетом полиморфизма генов BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) и APO-1/Fas (rs2234767). Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях повреждающего действия продуктов перекисидации на структуры ЩЖ, активации Fas - и каспазо-зависимых механизмов влияния на про - и анти-апоптотичні мишені индуцированная гиперпродукция и высвобождение TNF- α из тиреоидстимулированных лимфоцитов стимулирует дополнительный синтез других провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6, а также компенсаторно противовоспалительных белков в т.ч IL-4. Синхронно возрастает секреция растворимой формы рецептора TNF- α (sTNFR), что препятствует связыванию соответствующего цитокина со специфическим мембранным шеддингом ряда рецепторов и разъединяет апоптотические сигналы. Вышеуказанные изменения наиболее комплексно ассоциируют с полиморфными ва-

риантами генов BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) и только по отдельным показателям, почти втрое слабее с Fas (rs2234767).

Сокращения: УЗАИТ - узловой зоб на фоне аутоиммунного тиреоидита, ШЖ - щитовидная железа, АЦЗ - аденома щитовидной железы.

Ключевые слова: узловой зоб на фоне аутоиммунного тиреоидита, цитокины, апоптоз, щитовидная железа.

**ASSOCIATION OF CYTOKINE LEVEL IN BLOOD
SERUM AND THE APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES
WITH POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES OF BCL-
2 (RS17759659), CTLA-4 (RS231775) AND APO-1/FAS
(RS2234767) IN PATIENTS WITH NODULAR FORMS
OF GOITER COMBINED WITH AUTOIMMUNE
THYROIDITIS AND THYROID ADENOMA**

*M.I. Sheremet, L.P. Sydorhuk, Y.V. Gyrla, V.O. Shidlovskiy,
A.D. Bedenyuk, G.S. Kurochkin, A.V. Levitsky*

Abstract. Formulation of the problem. Based on the results of a histological study of removed TG tissue nodular goiter with autoimmune thyroiditis (NGAIT) was found in 10, 4% of the patients. Autoimmune thyroiditis (AIT) is one of the unsolved problems of modern endocrinology, as the issue of its etiology and pathogenesis insufficient, come now clear. Cytokines play an important role in the regulation of immune and inflammatory response, as the genes that encode them, are regarded as potential candidates for the risk of autoimmune thyroid pathology.

Analysis of recent research and publications. In domestic and foreign literature there are many publications devoted to the study of the morphology NGAIT. However, there remain a number of unresolved issues in particular the role of genetic factors in the development of AIT. According to the literature, when it is related to the mechanism multiple inheritance autoimmune thyroid disease in which each factor (hereditary and external) make a contribution to their development. The presence of family-based illness and genealogical research data is evidence of the important role of genetic factors in the pathogenesis of AIT. Confirms their view information about that as a result of the full genetic scans were found some loci associated with the AIT, with a key role in predisposition play a gene HLA (human leukocyte antigen) system and protein-4 associated with cytotoxic T cells (Cytotoxic T lymphocyte-associated-protein 4, CTLA4). But the effect of these genes on the overall genetic susceptibility to AIT is only about 5%.

The purpose of the work. Study of cytokines in peripheral blood and apoptosis of lymphocytes in NGAIT and TA patients based preparedness cells to apoptosis (content of lymphocytes that carry a marker of apoptosis - CD95 + receptor), the number of apoptotic lymphocytes (annexin V + lymphocytes) and content proapoptotic tumor necrosis factor - α (TNF- α), IL-1 β and IL-6 as well as anti-inflammatory IL-4 in serum based polymorphism BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) and APO-1 / Fas (rs2234767) genes.

Methods. An analysis of the frequency of polymorphic variants of genes BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775), APO-1 / Fas (rs2234767), the number of apoptotic lymphocytes (annexin V + lymphocytes) and content proapoptotic tumor necrosis factor - α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 and anti-inflammatory IL-4 in serum in patients with NGAIT and TA.

Results. The obtained results show that in terms of the damaging effects of peroxidation products in the TG structure, the activation of Fas - and caspase-dependent mechanisms of influence on pro - and antiapoptotic target induced hyperproduction and release of TNF- α from thyroid-stimulated lymphocytes stimulates further synthesis of other proinf-

lammatory cytokines IL-1 β and IL-6, as well as compensatory contraposing proteins including IL-4.

Conclusions. Simultaneously the secretion of the soluble form of receptor TNF- α (sTNFR) increases, which inhibits the binding of the appropriate cytokine-specific membrane shedding of a number of receptors and separates apoptosis signals. The above changes are most comprehensively associated with polymorphic variants of genes of BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) and only by certain indicators, almost three times weaker than with Fas (rs2234767).

Abbreviations: NGAIT - nodular goiter on the background of autoimmune thyroiditis, thyroid, TG-thyroid gland, TA - thyroid adenoma.

Key words: nodular goiter with autoimmune thyroiditis, cytokines, apoptosis, thyroid gland

HSEE of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

HSEE of Ukraine "State Medical University named after I.Ya. Horbachevsky", Ternopil

HSEE of Moldova "State University of Medicine and Pharmacy named after Nicolae Testemitanu", Kishinev

Clin. and experim. pathol. -2017.-Vol.16,№2(60),ч.2.-P.167-178.

Надійшла до редакції 12.04.2017

Рецензент – проф. І. Ю. Олійник

© М.І. Шеремет, Л.П. Сидорчук, Я.В. Гирла, В.О.

Шідловський, А.Д. Беденюк, Г.С. Курочкин, А.В. Левицький,

2017