

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.П.Храброва, Е.А.Ляшенко

**ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»,
кафедра хирургии с основами торакальной, кардиоваскулярной
и пластической хирургии
Луганск, Украина**

В статье представлены данные исследования функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови 48 больных хроническим аутоиммунным тиреоидитом, манифестным гипотиреозом и 38 больных диффузным токсическим зобом, манифестным тиреотоксикозом. Определялись миграционная активность, фагоцитарное число, фагоцитарный индекс, индекс спонтанной адгезии, процентное содержание нейтрофильных гранулоцитов с маркером апоптоза CD95+. У больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы снижена активность нейтрофильных гранулоцитов: фагоцитарное число, миграционная активность; умеренно повышен индекс спонтанной адгезии, повышен процент CD95+-клеток, что свидетельствует о «предуготованности» нейтрофильных гранулоцитов к апоптозу. Указанные изменения несколько более выражены у больных хроническим аутоиммунным тиреоидитом, чем у больных диффузным токсическим зобом.

***Ключевые слова:* хронический аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, нейтрофильный гранулоцит, функциональная активность.**

Введение

Тема аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АЗЩЖ) является одной из актуальных проблем современной эндокрино-

логии. К классическим АЗЩЖ относят тиреоидит Хашимото (хронический аутоиммунный тиреоидит — ХАИТ) и диффузный токсический зоб (ДТЗ). Патогенез данных заболеваний тесно связан с нарушениями иммунной системы [4, 5, 8].

В развитии аутоиммунного воспаления принимают активное участие нейтрофильные гранулоциты (НГ). НГ занимают активную позицию в системе гуморально-клеточной кооперации и являются ключевыми инструментами инициации и определения направленности течения воспаления [3]. Известно, что НГ способны оказывать иммунорегуляторное действие посредством секреции ряда цитокинов, избыточная продукция которых является фактором гиперактивации интратиреоидного воспалительного процесса [7]. В то же время изменения активности щитовидной железы (ЩЖ) приводят к существенным сдвигам в системе крови и, в частности, к нарушениям структурно-функционального состояния полиморфно-ядерных лейкоцитов [1, 2].

Учитывая тот факт, что дисрегуляции иммунитета (врождённого, адаптивного) и апоптоза являются ведущими звеньями в патогенезе АЗЩЖ, целью данного исследования явилось изучение апоптоза и функциональной активности НГ периферической крови у больных с ХАИТ и ДТЗ.

Материалы и методы исследования

В основу работы положен анализ результатов исследования миграционной активности (МА), фагоцитарного числа (ФЧ), фагоцитарного индекса (ФИ), индекса спонтанной адгезии (ИСА), процента клеток, экспрессирующих маркер апоптоза CD95+, среди НГ периферической крови 86 пациентов с АЗЩЖ, которые проходили лечение в эндокринологическом отделении Луганской городской больницы №5 и терапевтическом отделении городской больницы г. Счастье Луганской области в период с 2008 по 2010 гг. Из числа данных пациентов 48 больных (6 мужчин и 42 женщины), в возрасте от 31 до 76 лет ($55,1 \pm 2,2$) имели диагноз: «ХАИТ, манифестный гипотиреоз»; 38 больных (5 мужчин и 33 женщин) в возрасте от 17 до 56 лет ($33,8 \pm 2,7$) имели диагноз: «ДТЗ, манифестный тиреотоксикоз». Диагноз ДТЗ устанавливался на основании симптомов тиреотоксикоза, высокой концентрации тиреоидных гормонов (T_3 и T_4), снижения ТТГ, диффузного увеличения ЩЖ, наличия в сыворотке крови антитиреоидных аутоантител. Продолжительность заболе-

вания ДТЗ составляла 2-5 мес, все пациенты с ДТЗ были обследованы в начале заболевания до назначения тиреостатической терапии. Диагноз ХАИТ, манифестного гипотиреоза устанавливался на основании повышенного уровня ТТГ, снижения уровня свободного T_4 , повышения титра антител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО), ультразвукового исследования и пункционной биопсии ЩЖ, которая выявляла её лимфоидную и плазмноклеточную инфильтрацию. Средняя продолжительность заболевания ХАИТ составила $6,1 \pm 2,6$ года. Критериями исключения больных из исследования служили: наличие других аутоиммунных заболеваний, а также сопутствующих заболеваний, требующих параллельного лечения, беременность, лактация, узловые образования в ЩЖ по данным сонографии.

С целью создания собственных нормативных показателей обследовано 38 практически здоровых доноров (5 мужчин, 33 женщины) в возрасте от 20 до 50 лет (средний возраст $32,4 \pm 1,2$ года), которые составили контрольную группу — референтная норма. У них отсутствовала патология ЩЖ, которая исключалась на основании анамнестических и клинических данных, а также лабораторных показателей ее функционального состояния (концентрация ТТГ, свободного T_3 , свободного T_4 в сыворотке крови в пределах нормативных значений) и ультразвукового исследования ЩЖ (патологии не выявлено). Кроме того, они не имели хронических или рецидивирующих заболеваний, в том числе инфекционного, аутоиммунного, аллергического, опухолевого генеза; частота ОРЗ по данным анамнеза составляла не более двух раз в году, причем последнее заболевание — не позднее, чем за 3 месяца до исследования. Отклонений в функции других органов и систем у здоровых доноров выявлено не было, проживали они в том же регионе — город Луганск и Луганская область, что и обследуемые пациенты.

Для определения миграционной активности (МА) нейтрофилов использовали капилляры с внутренним диаметром $0,8 \pm 0,1$ мм и длиной 6-7 см, которые заполняли гепаринизированной кровью по 0,2 мл на 2/3 длины. Затем капилляры запечатывали парафином с обеих сторон и центрифугировали 5 минут при 1000 об./мин. Отмечали уровень расположения лейкоцитов над эритроцитами после центрифугирования. Затем капилляры инкубировали при 37°C 24 часа. Измеряли прирост осадка лейкоцитов от отметки их исходного уровня до границы основной массы клеток при помощи окуляр-микрометра.

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов оценивали по способности поглощать частицы монодисперсного (1,7 мкм) полистирольного латекса. В ячейку иммунологического планшета помещали 0,1 мл цельной гепаринизированной крови и добавляли 0,1 мл взвеси стандартных частиц латекса в концентрации 10^8 частиц/мл, инкубировали в термостате при 37°C течение 30 минут. Приготовленные мазки фиксировали метанолом, окрашивали азур А-эозином по методу Романовского-Гимза. С помощью иммерсионной микроскопии после подсчёта 200 клеток определяли фагоцитарное число (ФЧ) — число фагоцитов, содержащих частицы латекса в цитоплазме (%) и фагоцитарный индекс (ФИ) — число частиц латекса в подсчитанных клетках в пересчёте на 1 клетку (у.е./кл). Применялись тест-наборы ООО «ДИА-М» (Россия).

Индекс спонтанной адгезии (ИСА) — величина отношения числа адгезивных клеток к числу неадгезивных клеток в составе выделенного лейкоконцентрата крови после 1,5 часовой инкубации при температуре 37°C , выраженная в процентах (%). Концентрат нейтрофилов периферической крови получали посредством центрифугирования на двойном градиенте плотности фиколе-верографине. ИСА — показатель, отражающий адгезивные свойства лейкоцитов, предложен для оценки суммарного уровня экспрессии молекул адгезии на поверхности лейкоцитов крови. Исследование ИСА нейтрофилов проводилось по методу М.Н. Goldrosen, 1979, в модификации Н.Л. Вартаняна и соавт., 1988. Показатель спонтанной адгезии определяли как отношение разности количества клеток до инкубации и после нее в 5 больших квадратах камеры Горяева к количеству клеток до инкубации, выраженному в процентах.

Процентное определение количества CD95+ -клеток среди НГ осуществляли методом непрямой поверхностной иммунофлюоресценции с использованием наборов фирмы «МедБиоСпектр» (Россия) согласно инструкции производителя.

Полученный цифровой материал был обработан с помощью вариационно-статистических методов путём расчёта средней арифметической, стандартной ошибки средней арифметической. Различия показателей рассчитывались методом вариационной статистики по критерию Стьюдента и считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У здоровых лиц контрольной группы МА НГ составила $75,6 \pm 3,8$ мкм/сут, ФЧ НГ — $71,9 \pm 3,8\%$, ФИ НГ — $2,46 \pm 0,14$ у.е./кл., ИСА НГ $20,6 \pm 6,7\%$.

У больных ДТЗ, манифестным тиреотоксикозом МА НГ была на $36,9\%$ ниже ($p < 0,001$), чем в контрольной группе, и составила $47,7 \pm 2,9$ мкм/сут. ФЧ НГ у больных ДТЗ составило $51,2 \pm 2,7\%$, что было на $28,8\%$ ниже данного показателя в контрольной группе ($p < 0,001$). ФИ НГ у больных ДТЗ, манифестным тиреотоксикозом составил $1,72 \pm 0,08$ у.е./кл., что было на $30,1\%$ ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). У больных ДТЗ, манифестным тиреотоксикозом ИСА НГ составил $26,9 \pm 8,6\%$, что было на $30,6\%$ выше, чем ИСА НГ в контрольной группе. Таким образом, у больных ДТЗ с манифестным тиреотоксикозом отмечалось снижение активности НГ: МА, ФИ, ФЧ, тогда как чувствительность НГ к регуляторным сигналам, т.е. ИСА НГ у больных ДТЗ была на $30,6\%$ выше, чем в контрольной группе.

У больных ХАИТ, манифестным гипотиреозом МА НГ была на $50,3\%$ ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,001$) и составила $37,6 \pm 2,2$ мкм/сут. Отмечалось снижение ФЧ НГ почти в 2 раза до $37,8 \pm 2,7\%$ ($p < 0,001$). ФИ НГ у больных ХАИТ, манифестным гипотиреозом статистически не отличался от нормальных величин и составил $2,78 \pm 1,09$ у.е./кл. ИСА НГ у больных ХАИТ, манифестным гипотиреозом был повышен до $32,5 \pm 11,5\%$, что было на $57,8\%$ выше ИСА НГ в контрольной группе. Таким образом, у больных ХАИТ с манифестным гипотиреозом отмечалось снижение миграционной и фагоцитарной активности НГ, повышение их чувствительности к регуляторным воздействиям, т.е. повышение ИСА НГ.

При сравнении показателей активности НГ между группой больных с ХАИТ и группой больных с ДТЗ отмечено, что у больных ХАИТ снижение фагоцитарной и миграционной активности было более выражено. Так у больных ХАИТ показатель МА НГ был на $21,2\%$ ниже, чем у больных ДТЗ ($p < 0,05$). ФЧ НГ у больных ХАИТ было на $26,2\%$ ниже, чем ФЧ НГ у больных ДТЗ ($p < 0,05$). ФИ НГ у больных ХАИТ был на $61,6\%$ выше, чем у больных ДТЗ. ИСА НГ у больных ХАИТ был на $20,8\%$ выше, чем у больных ДТЗ. Результаты исследования активности НГ у больных ХАИТ и ДТЗ приведены в табл. 1.

Показатели активности НГ у больных АЗЩЖ

Показатель	Контрольная группа, n=38	ХАИТ, манифестный гипотиреоз, n=48	ДТЗ, манифестный тиреотоксикоз, n=38
МА НГ, мкм/сут.	75,6±3,8	37,6±2,2 ^{*Δ}	47,7±2,9 ^{*Δ}
ФЧ НГ, %	71,9±3,8	37,8±2,7 ^{*Δ}	51,2±2,7 ^{*Δ}
ФИ НГ, у.е./кл.	2,46±0,14	2,78±1,09	1,72±0,08
ИСА НГ, %	20,6±6,7	32,5±11,5	26,9±8,6
CD 95+, %	18,6±1,3	35,4±1,5 ^{*Δ}	29,7±1,6 ^{*Δ}

Примечания: * — $p < 0,05$ при оценке достоверности различий средних с контрольной группой, ^Δ — $p < 0,05$ при оценке достоверности различий средних между группой с ХАИТ, манифестным гипотиреозом, и группой с ДТЗ, манифестным тиреотоксикозом.

У больных АЗЩЖ отмечалось увеличение процента нейтрофилов с экспрессией маркера апоптоза CD95 (Fas-антиген) (табл. 1). У больных ДТЗ, манифестным тиреотоксикозом CD 95+НГ составили 29,7±1,6%, что на 59,7% больше, чем в контрольной группе здоровых доноров ($p < 0,001$). У больных ХАИТ, манифестным гипотиреозом CD 95+НГ составили 35,4±1,5%, что превышало данный показатель в контрольной группе на 90,3% ($p < 0,001$). Процент CD 95+НГ у больных ХАИТ был несколько больше, чем у больных ДТЗ ($p < 0,05$).

Выводы

1. У больных АЗЩЖ снижена активность НГ: фагоцитарное число, миграционная активность.
2. У больных АЗЩЖ умеренно повышен индекс спонтанной адгезии НГ.
3. Процент CD 95+-клеток среди НГ у больных АЗЩЖ повышен, что свидетельствует о «предуготованности» НГ к апоптозу.
4. Указанные изменения несколько более выражены у больных ХАИТ, чем у больных ДТЗ.

Литература

1. Мусаева Д.О. Состояние антимикробных систем нейтрофильных гранулоцитов крови при функциональных нарушениях щитовидной железы: дис.... канд. мед.наук: 14.00.03 / Мусаева Джамилия Омаровна. — Махачкала, 2005. — 129 с.

2. Савченко А.А. Информативность показателей активности ферментов лимфоцитов у больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / А.А.Савченко, С.Г.Кадричева, С.А.Догалин [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 2003. — Т. 49, №3. — С. 18-22.
3. Уразова О.И. Апоптоз нейтрофилов и иммунорегуляторные цитокины при аутоиммунных тиреопатиях / О.И.Уразова, Е.Б.Кравец, В.В.Новицкий [и др.] // Клиническая и экспериментальная эндокринология. — 2007. — Т. 3, №4. — С. 49-53.
4. Фадеев В.В. Болезнь Грейвса // Рус.мед. жур. — 2002. — Т. 10, №27. — С. 1262-1265.
5. Эндокринология. Национальное руководство / Под.ред. И.И.Дедова—М: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1072 с.
6. Alnaqdy A. Determination of the levels of anti-thyroid-stimulating hormone receptor antibody with thyroid peroxidase antibody in Omani patients with Graves' disease /A.Alnaqdy, M.Al-Maskari// Med. Princ. Pract. — 2005. — Vol. 14, №4. — P. 209-212.
7. DoganR.N.E. Absence of IL-4, and Not Suppression of the Th2 Response, Prevents Development of Experimental Autoimmune Graves' Disease / R.N.E.Dogan, C.Vasu, M.J.Holterman[et al.] // J. Immunol. — 2003. — Vol. 170. — P. 2195-2204.
8. Rapoport B. Thyroid autoimmunity /B.Rapoport, S.M.McLachlan// J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108,№9. — P. 1253-1259.

О.П.Храброва, Є.О.Ляшенко. Дослідження показників активності нейтрофілів у хворих з аутоімунними захворюваннями щитовидної залози. Луганськ, Україна.

Ключові слова:хронічний аутоімунний тиреоїдит, дифузний токсичний зоб, нейтрофільний гранулоцит, функціональна активність.

У статті представлені дані дослідження функціональної активності нейтрофілів периферичної крові 48 хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з маніфестним гіпотиреозом і 38 хворих дифузним токсичним зобом, маніфестним тиреотоксикозом. Визначалися міграційна активність, фагоцитарне число, фагоцитарний індекс, індекс спонтанної адгезії, процентний вміст нейтрофілів з маркером апоптозу CD95+. У хворих на аутоімунні захворювання щитовидної залози знижена активність нейтрофілів: фагоцитарне число, міграційна активність; помірно підвищений індекс спонтанної адгезії, підвищений відсоток CD95+-клітин, що свідчить за схильність нейтрофілів до апоптозу. Зазначені зміни більше виражені у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит, ніж у хворих на дифузний токсичний зоб.

E.P.Hrabrova, Ye.A.Lyashenko. The research of neutrophilous activity indicators in patients with autoimmune thyroid diseases. Lugansk, Ukraine.

Keywords: chronic autoimmune thyroiditis, diffuse toxic goiter, neutrophilous granulocytes, functional activity.

The article presents data from a study of the functional activity of peripheral blood neutrophilous granulocytes in 48 patients with chronic autoimmune thyroiditis, manifest hypothyroidism and in 38 patients with diffuse toxic goiter, manifest hyperthyrosis. The migration activity, phagocytic number, phagocytic index, an index of spontaneous adhesion of neutrophilous granulocytes, percentage of apoptotic marker CD95+ were determined. In patients with autoimmune thyroid diseases reduced activity of neutrophilous granulocytes (phagocytic number, migratory activity), moderately elevated spontaneous adhesion index, increased the percentage of CD95+-cells were recorded, which are evidence of the neutrophilous granulocytes susceptibility to apoptosis. These changes are more pronounced in patients with chronic autoimmune thyroiditis than in patients with diffuse toxic goiter.