

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»

На правах рукописи

Биктагирова Эльнара Маулетовна

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АУТОИММУНИТЕТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЦИТАРНОМ ТИРЕОИДИТЕ

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2011

Работа выполнена на кафедре биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Абрамова Зинаида Ивановна

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Вагапова Гульнар Рифатовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Фаизов Тагир Хадиевич

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Коксин Владимир Петрович

Ведущая организация: ГОУ ВПО Казанский государственный
медицинский университет (г. Казань)

Защита состоится 22 сентября 2011 года в «13⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. **211**.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан “22” августа 2011 г.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ к.104, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З. И., факс: (843) 238-76-01

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук



Абрамова З.И

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Хронический лимфоцитарный тиреоидит (аутоиммунный тиреоидит (АИТ), тиреоидит Хашимото) - одно из наиболее распространенных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ), частота которого среди взрослого населения колеблется от 6 до 11% (Валдина Е.А., 2001; Балаболкин М.И., 2002, Зефирова Г.С., 1999, Петунина Н.А., 2002). Исследования последних десятилетий указывают на мультифакторную природу данного заболевания (Davies T.F, 1998), но вопросы этиологии и патогенеза, терапии и прогноза заболевания не получили еще своего окончательного решения (Дедов И.И., 2003).

В настоящее время известно, что в основе развития аутоиммунных заболеваний, в том числе и АИТ, лежит нарушение процессов программируемой клеточной гибели, в частности апоптоза (Квачева Ю.Е., 2002; Петрищев Н. Н., 2008). Интерес к апоптозу обусловлен тем, что этот процесс тесно связан с целым рядом тех сигнал-проводящих систем (интерлейкины (IL), интерфероны, нуклеазы), изменение которых имеет патогенетическое значение для АИТ. Тем не менее, механизмы дисрегуляции апоптоза в условиях реализации аутоиммунитета еще недостаточно исследованы (Недосекова Ю.В., 2009).

Рядом авторов показано, что маркером нарушения функционирования иммунной системы, приводящих к развитию и прогрессированию аутоиммунных заболеваний (АИЗ), являются аутоантитела (ААТ) к ДНК, которые, вероятно, и являются причиной деструкции тканей и органов, нарушая уровень физиологического апоптоза (Невинский Г.А., 2000, Сучков С.В., 2001). Различия в клинико-иммунологической картине АИТ (эу-, гипо- и гипертиреоз), видимо, связаны с феноменом гетерогенности ААТ (Сучков С.В., 2001), обладающих различными уровнями специфичности. Тем не менее, до настоящего времени нет единой точки зрения относительно причин и характера иммунных сдвигов, приводящих к утрате контроля над образованием ААТ и появлением, с одной стороны, абзимов с каталитическим и цитотоксическим эффектом, а с другой – ААТ к ДНК лишенных указанных свойств.

Кроме того, немаловажным фактором развития АИТ лежит изменение со стороны иммунокомпетентных регуляторных Т-клеток, генетический дефект которых, спровоцированный экзогенным воздействием, ведет к срыву их толерантности (Абрамова Н.А., 2006). На сегодняшний день существует более 100 генетических маркеров, которые тем или иным образом ассоциированы с развитием аутоиммунных патологий ЩЖ (Кандрор В.И., 2001). При этом фенотипическое проявление генетического полиморфизма в значительной мере зависит от генофонда

и условий жизни каждой конкретной популяции, чем и объясняется противоречивость данных по ассоциации полиморфизма генов-кандидатов с риском развития АИТ.

Таким образом, на сегодняшний день представляется актуальной комплексная оценка биохимических и генетических факторов нарушения аутоиммунитета при хроническом лимфоцитарном тиреоидите среди населения Республики Татарстан (РТ). В связи с вышесказанным,

целью данного исследования является характеристика аутоиммунного процесса при хроническом лимфоцитарном тиреоидите и выявление генетических факторов риска развития данной патологии у населения РТ.

В соответствии с целью, были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать процесс аутоиммунитета и апоптоза при хроническом лимфоцитарном тиреоидите по содержанию специфических (аннексин V, TRAIL и TNF- α) и неспецифических (АТ к нативной ДНК (нДНК), денатурированной ДНК (дДНК)) маркеров.

2. Исследовать наличие ДНК-гидролизующей активности АТ к ДНК в сыворотке крови больных хроническим лимфоцитарным тиреоидитом и здоровых лиц.

3. Изучить связь между показателями активности аутоиммунитета: уровня органоспецифических (АТ к тиреоглобулину (АТ-ТГ), АТ к тиреопероксидазе (АТ-АТ-ТПО)) и неспецифических АТ к ДНК с функциональным состоянием ЩЖ при хроническом лимфоцитарном тиреоидите.

4. Изучить ассоциацию полиморфизмов: -318С/Т, -1661А/Г и +49А/Г гена *CTLA-4*, -1858С/Т гена *PTPN22*, -308А/Г гена *TNF- α* , -609Г/Т, -1135Т/С гена *TNF-R1*, +196Т/Г, del15bp гена *TNF-R2*, +3953С/Т гена *IL-1 β* , -590С/Т гена *IL-4*, -174С/Г гена *IL-6* с риском развития хронического лимфоцитарного тиреоидита и степенью активности аутоиммунного процесса у населения РТ.

Научная новизна

Впервые охарактеризован процесс программируемой клеточной гибели при хроническом лимфоцитарном тиреоидите по трем специфическим маркерам: аннексин V, TRAIL и TNF- α . Показано, что при АИТ в стадии гипертиреоза имеет место TRAIL-индуцированный апоптоз с преобладанием некротических процессов.

Показано преобладание ААТ к денатурированной ДНК (АТ к дДНК) в сыворотке крови больных АИТ, при этом общий пул АТ к ДНК характеризовался изменением степени ДНК-гидролизующей активности и субстратной специфичности в процессе течения заболевания.

Исследована генетическая предрасположенность к хроническому лимфоцитарному тиреоидиту у населения РТ по 12 полиморфизмам 8 генов, продукты которых принимают участие в регуляции иммунного ответа.

Впервые проведен комплексный анализ по выявлению биохимических и генетических маркеров нарушения аутоиммунитета при хроническом лимфоцитарном тиреоидите.

Научно-практическая значимость работы

Данные, полученные в результате исследования, могут служить основой для формирования групп повышенного риска развития АИТ и разработки дифференцированных программ профилактики и ранней диагностики заболевания у конкретного человека с учетом данных генотипирования.

Материалы исследования представляют интерес в области биохимии, генетики популяций, медицины и могут быть использованы в учебном процессе на биологических и медицинских факультетах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Функциональное состояние ЩЖ при хроническом лимфоцитарном тиреоидите зависит от характера патологического процесса - апоптоз/некроз, что отражается в кластеризации специфических (АТ-ТГ, АТ-ТПО) и неспецифических (АТ к ДНК) ААТ, а также в изменении степени гидролитической активности и субстратной специфичности АТ к ДНК в процессе течения заболевания.

2. Повышенный уровень TRAIL отражает преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами при АИТ в стадии гипертиреоза.

3. Генетическими маркерами активации апоптоза и индукции аутоиммунитета при АИТ с высокой активностью аутоиммунного процесса являются полиморфизмы генов *TNF- α* и его рецепторов, *IL-1 β* , *IL-4* и *CTLA-4*.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского государственного университета (Казань, 2008 г.); научно-практической конференции «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета» (памяти В.Г. Винтера) (Казань, 2009); Симбиозе-2009 (II Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов) (Пермь, 2009 г.); Всероссийском конгрессе «Современные технологии в эндокринологии (тиреологика, нейроэндокринология, эндокринная хирургия)» (Москва, 2009); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов» (Санкт-Петербург, 2010); Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2010); Международной конференции «European Human Genetics Conference 2010» (Швеция, 2010); II Международной научно-практической конференции «Новые

концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2011).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, среди которых 2 публикации в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста, включает 17 рисунков и 17 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 233 ссылки, из которых 57 - на отечественные и 176 на зарубежные работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили образцы сыворотки венозной крови и ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом (Маниатис Т., 1984) 298 женщин: группу больных с диагнозом АИТ составила 161 женщина в возрасте от 20 до 60 лет, группу контроля - 137 здоровых доноров. Обе группы были сформированы на базе иммунологической лаборатории ГУ МКДЦ (г. Казань).

Диагноз хронического лимфоцитарного тиреоидита устанавливался эндокринологом на основании результатов ультразвукового исследования и оценки функционального состояния ЩЖ, по содержанию тиреотропного гормона, свободного тироксина и свободного трийодтиронина и определения титра АТ-ТПО и АТ-ТГ в сыворотке крови. Степень активности аутоиммунного процесса оценивалась по концентрации АТ-ТПО в сыворотке крови.

Дополнительным критерием при постановке диагноза служили данные по иммунофенотипированию лимфоцитов (определение на поверхности лимфоцитов венозной крови маркеров дифференциации ($CD4^+/CD8^+$)), проведенные методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США) с применением пакетного анализа «MultiSet TM» и коммерческого набора «Multitest IMK Kit» («Becton Dickinson», США).

Как больные АИТ, так и лица группы контроля, представляли собой смешанную популяцию РТ и не состояли друг с другом в кровном родстве. Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

Определение уровня специфических маркеров апоптоза. Определение уровня аннексина V, TNF- α , и TRAIL в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов согласно инструкции фирмы-производителя («Bender MedSystem», Vienna, Austria).

Регистрацию продуктов проводили на спектрофотометре «Multiskan» (КНР) в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Определение уровня неспецифических маркеров апоптоза. Определение уровня ААТ к нативной (АТ к нДНК) и АТ к дДНК проводили методом ИФА согласно методике, предложенной Саттаровой с соавт. (Саттарова Л.И., 2000). Регистрацию продуктов проводили на спектрофотометре «Multiskan» (КНР) в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Определение ДНКазной активности антител к ДНК проводили в реакции *in vitro* с использованием в качестве субстрата коммерческий препарат ДНК плазмиды pBR322, выделенной из штамма *E.coli* XL-1Blue (ООО «СибЭнзим», г.Москва).

Реакцию гидролиза проводили в динамике, отбирая пробы через кратные промежутки времени при 37°C. ДНК-гидролизующую способность антител к ДНК оценивали по превращению суперскрученной ДНК плазмиды pBR322 в кольцевую и линейную формы. Оценку результатов гидролиза плазмидной ДНК pBR322 осуществляли методом электрофореза в агарозном геле с последующей визуализацией бромистым этидием с использованием геля документирующей системы Chemi Doc™ XRS (Bio-Rad Laboratories, США).

Генотипирование полиморфных локусов проводили методом аллель-специфичной ПЦР и ПДРФ-анализа с использованием праймеров, предложенных в работах (Allen R.A., 2001; Mitterski B., 2004; Velaga M.R., 2004; Lie-Ying Fan, 2005; Wen Kuo, 2005; Ni- Glossop G.R., 2005; Wang L., 2007; Nariman K., 2009) на амплификаторах «Терцик» (НПФ «ДНК - технология», г. Москва) и «МуСycler» (Bio-Rad Laboratories, США).

Продукты амплификации и рестрикции анализировали электрофорезом в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей визуализацией бромистым этидием с использованием геля-документирующей системы Chemi Doc™ XRS (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистический анализ. Для сравнения данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса (Лакин Г.Ф., 1990; Акберова Н.И., 2004), с поправкой Бонферрони (Акберова Н.И., 2004). Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (Лакин Г.Ф., 1990). Статистическую обработку выполняли с помощью пакета программ «Excel Office 2003».

Статистическую обработку данных по генотипированию проводили с помощью программы UNPHASED версии 3.1.5 (Frank Dudbridge, 2006, MRC Biostatistics Unit Robinson Way Cambridge CB2 0SR, UK, находится в режиме свободного доступа (<http://homepages.lshtm.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/>)).

Значимость различий между группами по частотам встречаемости аллелей и генотипов исследованных полиморфизмов оценивали по критерию χ^2 при уровне значимости $p=0,05$. Для оценки связи полиморфных локусов с развитием АИТ рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95% доверительных интервалов для ОШ (ДИ_{ОШ}).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика процесса программируемой клеточной гибели и аутоиммунитета при хроническом лимфоцитарном тиреоидите

Специфические маркеры апоптоза. К настоящему времени показана взаимосвязь между нарушениями регуляции процесса апоптоза и генезом аутоиммунных тиреопатий. Наибольший интерес вызывает регулирующее влияние на апоптоз биологически активных веществ, прежде всего цитокинов (Fas, TRAIL, TNF- α и др.) (Попов Л.С., 2004). Причем, TRAIL опосредует как апоптоз тиреоцитов, так и цитотоксических аутореактивных лимфоцитов (Nakahara M., 2009). TNF- α является гомологом FasL, что свидетельствует о его высокой апоптогенной активности.

Биохимические изменения при апоптозе включают транслокацию фосфатидилсерина (PS) с внутренней стороны плазматической мембраны лимфоцитов. Связываясь с PS на поверхности клетки, аннексин V, конъюгированный с флуорохромом, также служит маркером апоптоза (Gerke V., 2002).

В связи с этим, нами охарактеризован процесс апоптоза на основании количественной оценки трех специфических маркеров: аннексин V, TNF-, TRAIL (табл. 1).

По результатам наших исследований, показано достоверное повышение уровня TRAIL в сыворотке крови у больных АИТ с гипертиреозом по сравнению со здоровыми лицами.

Таблица 1. Средний уровень Аннексина V, TNF- α и TRAIL в сыворотке крови больных АИТ (АИТ«+») и группы условно здоровых лиц (АИТ «-»)

АИТ «+»	M \pm SD		
	Аннексин V, пг/мл	TNF- α , пг/мл	TRAIL, нг/мл
Гипертиреоз	0,258 \pm 0,0012	6,8 \pm 1,02	60,2\pm20,07¹
Гипотиреоз	0,257 \pm 0,0014	2 \pm 13,18	45,5 \pm 19,3
Эутиреоз	0,257 \pm 0,0014	3,05 \pm 18,44	41,6 \pm 14,7
АИТ «-»	0,258 \pm 0,001	1,89 \pm 16,48	39,38 \pm 11,6

¹ Достоверность различий ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой
M – среднее значение, SD – стандартное отклонение

Различий, достигших статистической достоверности между уровнем содержания TRAIL у больных АИТ с гипотиреозом, эутиреозом и условно здоровых доноров не выявлено, однако необходимо отметить тенденцию к снижению уровня TRAIL в сыворотке крови больных АИТ: гипертиреоз > гипотиреоз > эутиреоз, а

также разброс индивидуальных показателей уровня TRAIL у больных АИТ с гипотиреозом и эутиреозом. Возможно, увеличение экспрессии TRAIL при гипертиреозе сопровождается ростом чувствительности клеток и их готовности к запуску программы гибели. Это позволяет предполагать, что уровень TRAIL может являться критерием оценки активности аутоиммунного процесса. Повышение концентрации TRAIL и TNF- α в сыворотке крови как маркера некробиотических состояний было отмечено в ряде работ (Котович М.М., 2003; Хараева З.Ф., 2011).

Выявленные нами наиболее высокие показатели TRAIL у больных АИТ в состоянии гипертиреоза, по-видимому, отражают преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами у этой группы пациентов. С этих позиций отсутствие различий в уровнях TRAIL при АИТ в стадии эутиреоза и у здоровых лиц может служить положительным прогностическим критерием. С другой стороны, более низкое содержание TRAIL в сыворотке крови у больных АИТ в состоянии гипо- и эутиреоза может свидетельствовать об интенсивности образования домена смерти DR-5, который активно связывает TRAIL в связи с чем снижается его концентрация в сыворотке крови. В результате индукции TRAIL-опосредованного апоптоза происходит гибель тиреоцитов, в связи с чем, может повышаться концентрация FasL, что лишний раз обосновывает необходимость параллельного исследования маркеров апоптоза в других биологических объектах, помимо сыворотки крови.

Усиление синтеза TNF- α является ключевым фактором активации иммунокомпетентных клеток при ряде аутоиммунных заболеваний (Soogy A, 2002). Повышение концентрации TNF- α , наряду с повышением содержания TRAIL в сыворотке крови, многими исследователями рассматривается в качестве маркера некробиотических состояний (Котович М.М., 2003; Хараева З.Ф., 2011).

Нами обнаружена тенденция к повышению содержания TNF- α в сыворотке крови больных АИТ, не достигшая уровня статистической достоверности. Максимальное повышение уровня TNF- α в сыворотке крови при АИТ наблюдалось у пациентов в состоянии гипертиреоза (табл. 1). Таким образом, повышение TNF- α в сыворотке крови больных АИТ с гипертиреозом еще раз подтверждает тезис о возможном преобладании некротических процессов над апоптотическими у этой группы пациентов. Если судить по степени разброса индивидуальных показателей TNF- α при гипотиреозе (95% ДИ 0,99-5,61)- и эутиреозе (95% ДИ 2,59-5,9), то можно предположить, что уровень этого цитокина отражает зависимость функционального состояния ЩЖ от характера патологического процесса (апоптоз или некроз) в тиреоидной ткани.

По специфическому маркеру апоптоза аннексину V показано отсутствие значимых различий (табл. 1). Полученные данные частично согласуются с

результатами исследования Космачевой С.М. с соавт. (2004), которые показали отсутствие отличий в индукции апоптоза лимфоцитов у больных АИТ с эутиреозом и здоровых лиц.

Таким образом, установлено, что при хроническом лимфоцитарном тиреоидите имеет место TRAIL индуцированный апоптоз. Выявление максимального повышения уровня TRAIL при АИТ с гипертиреозом отражает преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами. Что согласуется с данными большинства исследователей, которые указывают на деструктивную природу гипертиреоза при АИТ (Volpe R., 1991; Балаболкин М.И., 2007).

Неспецифические маркеры апоптоза. Исследованиями ряда авторов было показано присутствие в сыворотке крови больных аутоиммунными тиреопатиями ДНК-связывающих АТ, проявляющих ДНКазную активность (Невинский Г.А., 2000; Бреусов А.А., 2001; Сучков С.В., 2002) и их определение рекомендовано для скрининга АИЗ (Коликова Ю.О., 2003). В настоящее время установлено, что АТ к ДНК, обладая гидролизующими свойствами ферментов, способны выступать в роли мощного регулятора апоптоза, скорость которого при хроническом лимфоцитарном тиреоидите многократно увеличивается (Кандрор, 2001), т.е. тиреоциты активно подвергаются данному процессу.

В связи с этим, нами проведена оценка уровня АТ к нДНК и дДНК в группе больных АИТ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (табл. 2).

Таблица 2. Средний уровень АТ к нДНК и дДНК у больных АИТ и у здоровых лиц.

	АТ к нДНК, оп.ед.		АТ к дДНК, оп.ед.	
	М±SD	95% ДИ	М±SD	95% ДИ
АИТ«+»	0,89±0,25	0,2-0,5	0,94±0,33¹	0,34-0,41
АИТ«-»	0,84±0,18	0,16-0,48	0,79±0,19	0,23-0,34

¹ Достоверность различий (p<0,05) по сравнению с контрольной группой
 М – среднее значение, SD – стандартное отклонение

По результатам наших исследований, у больных АИТ показана тенденция к увеличению ДНК-связывающих АТ, специфичных к нДНК (p>0,05) и достоверное повышение АТ к дДНК по сравнению с группой контроля (p<0,05). При этом, преобладание АТ к дДНК отмечено в группах больных с эу- и гипотиреозом (84,7% и 85% соответственно), и у 75% больных в состоянии гипертиреоза.

Подобные результаты были получены в работе Pedro A.B. с соавт. (2006), которые также показали преобладание АТ к дДНК в сыворотке больных АИТ, но только в состоянии эутиреоза (90% случаев). Возможно, это связано с тем, что дДНК более иммуногенна, чем нДНК. Предполагается, что в процессе аутоиммунизации к геномной ДНК первыми из общего пула сывороточных АТ образуются АТ к дДНК, но в дальнейшем по мере накопления соматических мутаций среди АТ-продуцирующих В-лимфоцитов наблюдается процесс созревания специфичности в

направлении от анти-дДНК к анти-нДНК. Следовательно, определение антител только к дДНК позволяет выявить возникновение заболевания в более ранние сроки (Сучков С.В., 2004; Kubota Т., 2002).

Учитывая роль ДНК-абзимов (ДНК-связывающих аутоантител с ДНК-гидролизующими свойствами) в патогенезе АИЗ и программированной клеточной гибели (Сучков С.В., 2002), обнаруженные АТ к ДНК были изучены на наличие каталитической активности в зависимости от функционального состояния ЩЖ.

Методы определения каталитической активности иммуноглобулинов пока недостаточно адаптированы для определения ферментативной активности цельных сывороток (Сучков С.В., 2001). В данной работе ДНКазная активность АТ к ДНК оценивалась по их способности превращать субстрат – суперспиральную ДНК рВR322 (I форма) – в кольцевую (II форма) и линейную (III форма) формы (рис.1).

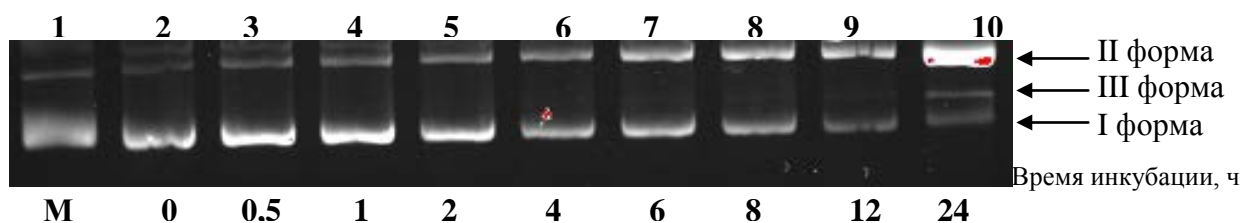


Рис. 1. Электрофореграмма определения ДНК-гидролизующей способности АТ к ДНК у больного АИТ с гипертиреозом в динамике. Дорожка 1- рВR322+гидролизующий буфер ТЕ; 2-10 – субстрат рВR322+ сыворотка больного АИТ в стадии гипертиреоза.

Анализ результатов гидролиза субстрата АТ к ДНК больных указывает на более высокую гидролитическую активность АТ к ДНК и их субстратную специфичность к одноцепочечной ДНК (рис. 2А). Однако гидролитическая активность и специфичность АТ к ДНК изменяется в зависимости от функционального состояния ЩЖ и течения заболевания (рис. 2).

Так, например, при гидролизе субстрата АТ к ДНК у больных АИТ с гипертиреозом по мере увеличения времени инкубации снижается количество суперскрученной ДНК (I форма), и нарастает количество продуктов ее расщепления: образование кольцевой формы ДНК (II форма) продолжается на протяжении 24 часов и появление линейной формы ДНК (III форма) через 6 часов от начала инкубации.

При гидролизе ДНК плазмиды АТ к ДНК у больных АИТ с гипотиреозом также снижается количество суперскрученной ДНК (I форма), и нарастает количество продуктов ее расщепления, однако линейная ДНК (III форма) появляется позднее, через 12 часов инкубации, что свидетельствует о более низкой гидролитической активности АТ к ДНК и их меньшей степени родства к одноцепочечной ДНК.

У больных в состоянии эутиреоза линейная ДНК появляется также позднее, чем у больных АИТ в стадии гипертиреоза, и через 24 часа гидролиза появляются

короткие олигонуклеотиды, что указывает на появление субстратной специфичности АТ к двунитовой ДНК.

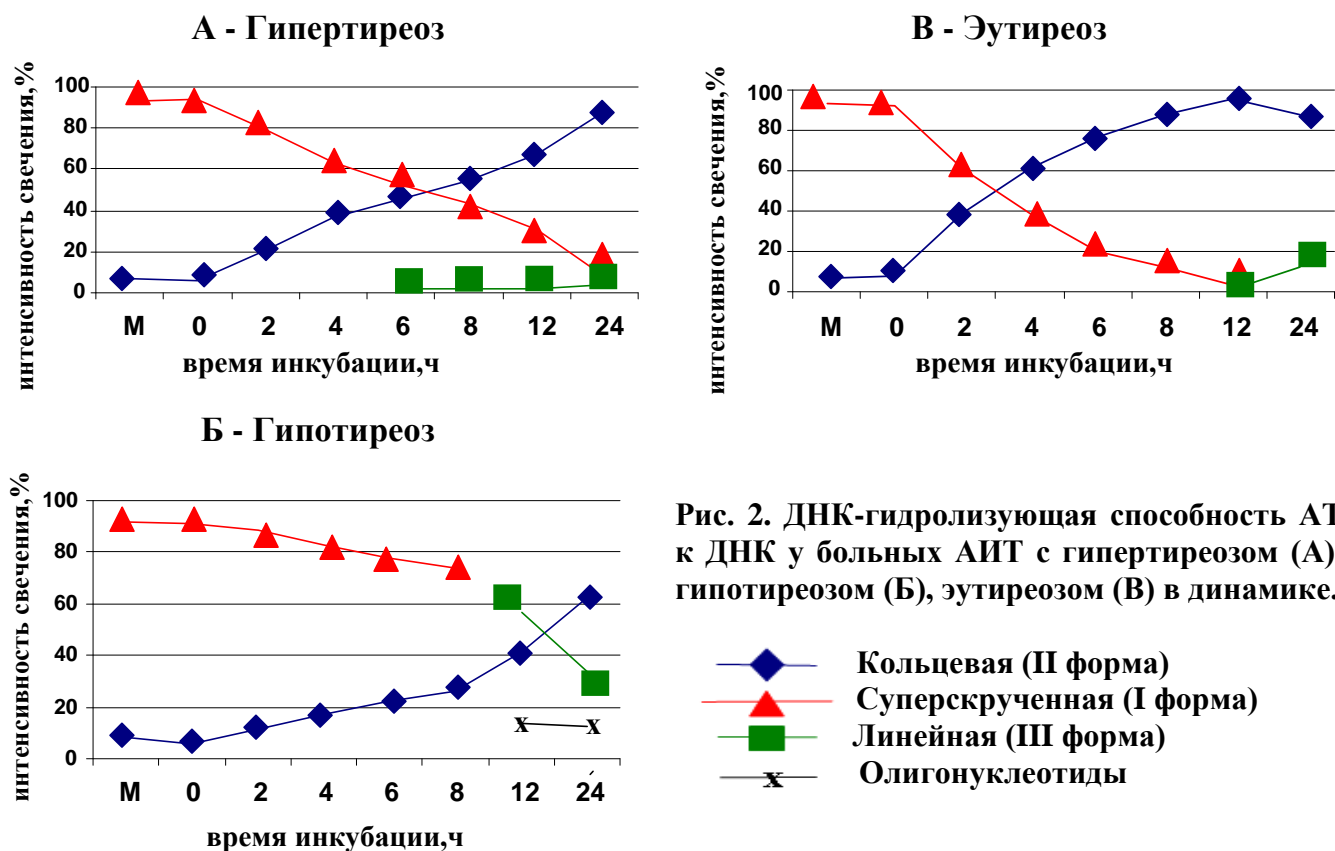


Рис. 2. ДНК-гидролизующая способность АТ к ДНК у больных АИТ с гипертиреозом (А), гипотиреозом (Б), эутиреозом (В) в динамике.

Таким образом, полученные данные указывают на изменение степени гидролитической активности АТ к ДНК и их субстратной специфичности у больных с АИТ, что, возможно, является отражением динамики и степени выраженности патологического процесса. Так, появление субстратной специфичности АТ к ДНК к двуцепочечной ДНК у больных АИТ в стадии эутиреозом можно расценивать как маркер нормализации процесса программируемой клеточной гибели.

Выявление связи между показателями активности аутоиммунитета: уровня органоспецифических АТ-ТГ, АТ-ТПО, неспецифических АТ к ДНК и функциональным состоянием ЩЖ при хроническом лимфоцитарном тиреоидите

Одним из диагностических критериев постановки диагноза хронического лимфоцитарного тиреоидита является обнаружение специфических антитиреоидных АТ, таких как АТ-ТГ и АТ-ТПО (Дедов И.И. и др., 2003). В нашем исследовании различная степень повышения титров АТ-ТГ и АТ-ТПО имела место у всех больных АИТ. Однако, согласно некоторым исследованиям, АТ-ТПО являются малоспецифичными для АИТ и могут обнаруживаться как при других заболеваниях ЩЖ, так и у 3-26% здоровых лиц (Knudsen N., 1999; Ladenson P.W., 2000), тогда как АТ-ТГ могут запускать механизм образования иммунных комплексов, приводить к

деструктивным изменениям в ЩЖ и снижению ее функции (Калинин А.П., 1994). С другой стороны, в качестве чувствительного, но неспецифичного скрининга АИТ, используется выявление АТ к ДНК (Коликова Ю.О., 2003), и антиядерных АТ (антинуклеарный фактор) (Ghazeeri GS, Kutteh W., 2001).

Данных о взаимовлиянии органоспецифичных (АТ-ТГ, АТ-ТПО) и неспецифичных (АТ к ДНК) АТ и их комплексной диагностической значимости, особенно при различных клинических вариантах течения АИТ, недостаточно. В связи с этим, нами проведен корреляционный анализ между содержанием АТ к ДНК и специфических АТ в общей выборке больных АИТ и у больных с различным функциональным состоянием ЩЖ.

По результатам анализа в общей группе больных АИТ установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем АТ-ТГ и АТ к нДНК ($R_s=0,38$, $p<0,05$), и обратная – между уровнем АТ-ТПО и АТ к дДНК ($R_s=0,2$, $p<0,05$), тогда как корреляционной зависимости между уровнем содержания АТ к дДНК и АТ-ТГ, а также АТ к нДНК и АТ-ТПО не выявлено.

Полученные результаты частично согласуются с немногочисленными данными литературы, поскольку в работах некоторых авторов показана прямая корреляционная зависимость между АТ-ТПО и АТ к нДНК при АИТ (Анчикова О.А., 2008).

Однако, при проведении корреляционного анализа в группах больных АИТ, разделенных в зависимости от функционального состояния ЩЖ (гипо-, эу- и гипертиреоз) обнаружен различный характер корреляционной зависимости между специфическими и неспецифическими ААТ (рис. 3).

Так, при гипертиреозе обнаружена прямая корреляционная зависимость высокой степени между уровнем АТ к ДНК, как к нативной, так и денатурированной, и уровнем АТ-ТГ и АТ-ТПО. В состоянии гипотиреоза наблюдалась прямая корреляционная зависимость низкой степени между АТ к нДНК, и обратная – между АТ к дДНК и АТ-ТГ, а при эутиреозе усиливалась обратная корреляция между АТ к нДНК и дДНК с одной стороны, и АТ к ТПО – с другой, не достигшая уровня статистической достоверности.

Возможно, одновременное повышение специфических и неспецифических ААТ при гипертиреозе свидетельствует о высокой активности аутоиммунного процесса с преобладанием некротических процессов над апоптотическими, которые, в свою очередь, могут вызывать повреждение тиреоидных клеток и усиливать аутоиммунные реакции. Отсутствие корреляционной зависимости между всеми показателями ААТ при двух других клинических проявлениях АИТ предполагает нормализацию процессов программированной клеточной гибели в сторону апоптоза

различной степени интенсивности (например, отсутствие зависимости между АТ-ТГ и АТ к ДНК при эутиреозе).

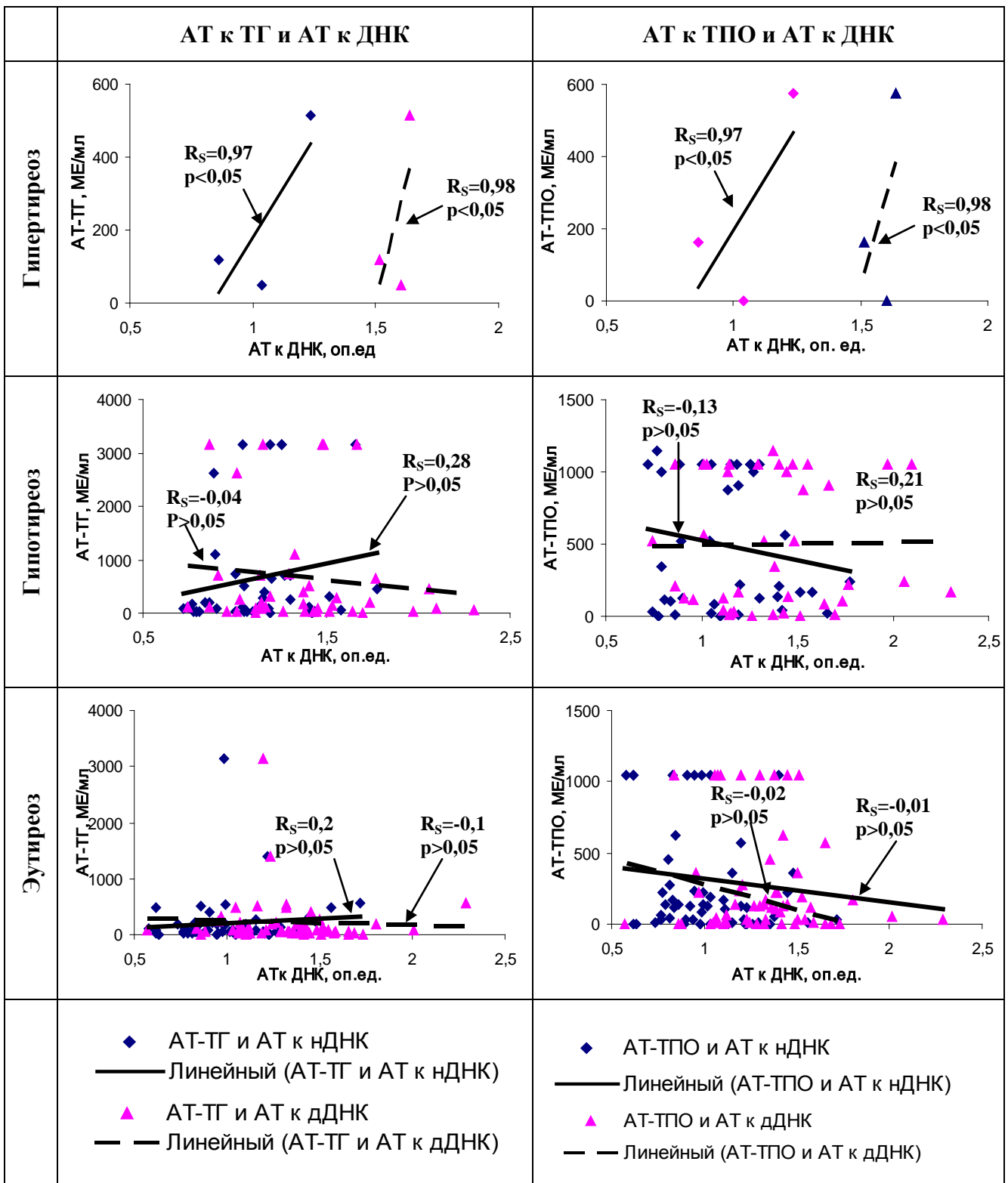


Рис.3. Корреляционный анализ между уровнем содержания АТ-ТГ, АТ-ТПО и АТ к нДНК, дДНК при различных клинических проявлениях АИТ (гипертиреоз, гипотиреоз, эутиреоз).

Кроме того, полученные данные, возможно, объясняются феноменом кластеризации ААТ (выявление различных сочетаний антитиреоидных АТ) и изменением функциональных свойств ААТ (появление АТ-ТГ и АТ-ТПО с протеолитической активностью) (Wen W., 2007; Андреева А.В., 2011) в процессе естественной эволюции хронического лимфоцитарного тиреоидита, либо на фоне проводимой терапии. При этом активность ААТ с протеолитической активностью обнаруживает корреляционную зависимость с тяжестью клинической картины АИТ, а также с явлениями дисфункции и разрушения ЩЖ (Андреева А.В., 2011). Однако данный вопрос требует дальнейшего детального исследования.

Генетические факторы риска развития хронического лимфоцитарного тиреоидита

На сегодняшний день предполагается, что одним из факторов развития аутоиммунных эндокринных заболеваний являются нарушения Т-клеточного звена. Методом проточной цитометрии нами показано достоверное увеличение доли субпопуляции $CD4^+$ лимфоцитов в группе больных АИТ, по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$) (рис.4). Среднее соотношение Т-лимфоцитов $CD4^+/CD8^+$ у больных было в 2 раза выше (Me 2,05, ДИ 1,22-0,89) по сравнению с контрольной группой (Me 0,99, ДИ 0,009-0,01), т.е. обнаружен дефицит Т-супрессоров ($CD8^+$) и активация Т-хелперов ($CD4^+$).

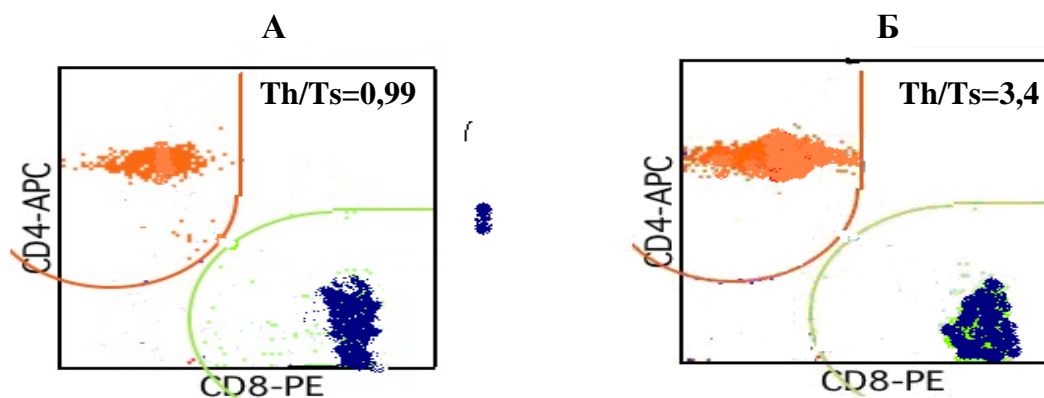


Рис.4 Содержание Т-хелперов (Th) ($CD4^+$ - APC) и Т-супрессоров (Ts) ($CD8^+$ - PE) в крови у здоровых лиц (А) и у больных АИТ (Б)

Согласно современным представлениям, дисбаланс Т-лимфоцитов обусловлен генетическим дефектом Т-супрессоров, что приводит к их взаимодействию с антигенами, которые индуцируют синтез антител рецепторного аппарата фолликулярного эпителия, оказывают повреждающее действие на тироциты (Кравец Е.Б., 2010). На сегодняшний день существует более 100 генетических маркеров, которые тем или иным образом ассоциированы с развитием аутоиммунных патологий ЩЖ (Кандрор В.И., 2001), однако их фенотипическое проявление зависит от

генетической предрасположенности индивида и условий жизни каждой конкретной популяции.

В связи с этим, нами проведен анализ ассоциации 12 полиморфных маркеров 8 генов-кандидатов с риском развития АИТ у населения РТ (табл. 3). Все изученные нами полиморфизмы находились в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Таблица 3. Характеристика полиморфных вариантов генов-кандидатов

Ген	Полиморфизм	Функция продукта	Локализация
CTLA-4	-1661A/G (rs4553808)	Ингибирование активации Т-лимфоцитов	промотор
	-318C/T (rs5742909)		промотор
	+49A/G (rs231775)		Экзон 1
PTPN22	-1858C/T (rs2476601)	Ингибирование активации Т-лимфоцитов	Экзон 14
TNF- α	-308A/G (rs1800629)	Провоспалительный цитокин, участвует в регуляции апоптоза	промотор
TNF-R1	-609G/T (rs4149570)	Участие в передаче сигнала апоптоза	промотор
	-1135 T/C (rs800692)		промотор
TNF-R2	+196T/G (rs1061622)	Участие в передаче сигнала апоптоза	Экзон 6
	del 15 bp		Экзон 10
IL-1 β	+3953C/T (rs1143634)	Провоспалительный цитокин, индуцирует экспрессию TNF-а и др.	Экзон 5
IL-4	-590C/T (rs2243250)	Противовоспалительный цитокин, ингибирует аутоиммунные реакции	промотор
IL-6	-174C/G (rs1800795)	Провоспалительный цитокин	промотор

По результатам сравнительного анализа было показано отсутствие ассоциации с риском развития АИТ полиморфизмов: -318C/T гена *CTLA-4*, -1858C/T гена *PTPN22*, -609G/T гена *TNFR1*, +196T/G гена *TNFR2*, -590C/T гена *IL-4*, -174C/G гена *IL-6*, тогда как SNP -1661A/G и +49A/G гена *CTLA-4*, -308A/G гена TNF- α , -1135T/C гена *TNFR1*, del15bp гена *TNFR2*, +3953C/T гена *IL-1 β* , вносят вклад в формирование генетической предрасположенности к хроническому лимфоцитарному тиреоидиту у населения РТ (табл. 4).

Таблица 4. Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам изученных генов среди больных АИТ и лиц группы контроля

Аллель/ Генотип	Частота встречаемости		P	ОШ	Аллель/ Генотип	Частота встречаемости		P	ОШ
	АИТ «+»	АИТ «-»				АИТ «+»	АИТ «-»		
-1661 A/G гена CTLA-4					-174C/G гена IL-6				
A	0,732	0,806	0,81	-	C	0,589	0,603	0,721	-
G	0,267	0,193	0,04*	1,52	G	0,41	0,396	0,721	-
AA	0,472	0,615	0,78	-	CC	0,387	0,357	0,597	-
AG	0,519	0,371	0,04	-	CG	0,403	0,493	0,128	-
GG	0,007	0,012	0,83	1,83	GG	0,209	0,149	0,187	-
-318 C/T гена CTLA-4					-308 A/G гена TNF-α				
C	0,867	0,898	0,61	-	A	0,54	0,79	8,17·10⁻⁸	0,3
T	0,133	0,102	0,86	-	G	0,45	0,21	8,17·10⁻⁸	3,18
CC	0,742	0,803	1	-	AA	0,27	0,62	5,2·10⁻⁷	0,09
CT	0,250	0,191	0,87	-	AG	0,53	0,34	0,005	3,52
TT	0,008	0,006	0,89	-	GG	0,19	0,04	0,00068	10,85
+49 A/G гена CTLA-4					-1135 T/C гена TNF-R1				
A	0,489	0,652	0,76	-	C	0,72	0,48	4,85·10⁻⁹	2,84
G	0,511	0,348	0,012	2,0	T	0,27	0,51	4,85·10⁻⁹	0,35
AA	0,214	0,373	0,89	-	CC	0,58	0,24	1,04·10⁻⁸	5,04
AG	0,550	0,557	1	-	TC	0,28	0,46	0,001	0,25
GG	0,237	0,07	0,001	4,04	TT	0,13	0,28	0,002	0,19
1858 C/T гена PTPN22					-609G/T гена TNF-R1				
C	0,87	0,88	1	-	G	0,69	0,67	0,79	-
T	0,12	0,11	1	-	T	0,3	0,32	0,79	-
CC	0,78	0,77	1	-	GG	0,42	0,4	0,78	-
CT	0,17	0,21	0,89	-	GT	0,54	0,55	0,85	-
TT	0,036	0,0062	0,55	-	TT	0,037	0,04	0,83	-
+3953C/T гена IL-1β					+196T/G Гена TNF-R2				
C	0,63	0,48	0,0003	1,87	G	0,45	0,5	0,31	-
T	0,365	0,52	0,0003	0,53	T	0,54	0,49	0,32	-
CC	0,32	0,233	0,084	-	GG	0,17	0,26	0,11	-
CT	0,61	0,49	0,048	6,5	GT	0,55	0,46	0,21	-
TT	0,058	0,27	4,95·10⁻⁶	0,15	TT	0,26	0,26	0,93	-
-590C/T гена IL-4					ins/del 15 bp гена TNF-R2				
C	0,67	0,68	0,753	-	I	0,6	0,58	0,62	-
T	0,32	0,31	0,753	-	D	0,39	0,41	0,63	-
CC	0,47	0,46	0,88	-	II	0,41	0,25	0,01	0,7
CT	0,4	0,44	0,47	-	ID	0,38	0,65	4,95·10⁻⁵	0,35
TT	0,128	0,093	0,37	-	DD	0,2	0,08	0,01	1,41

Ген CTLA-4 Молекулы CTLA-4 играют важную роль в аутоотолерантности: при представлении антигенпрезентирующими клетками аутоантигена, связывание CTLA-4 ведет к апоптозу Т-клеток и отсутствию иммунного ответа.

Одними из наиболее диагностически значимых полиморфизмов данного гена являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в положении -1661A/G и -318C/T промоторной области гена, влияющих на экспрессию гена, а также транзиция аденина

на гуанин в положении +49 экзона 1 (+49A/G), приводящая к снижению функциональной активности белка CTLA-4.

Проведенный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным вариантам гена *CTLA-4* показал статистически значимое увеличение доли гомозиготного генотипа GG и аллеля G по полиморфному локусу +49A/G в группе больных АИТ, а также гетерозиготного генотипа A/G и аллеля G полиморфизма -1661A/G (ОШ=1,84, ДИ_{ош} 2,31-1,4 и ОШ=1,52, ДИ_{ош} 2,0-1,1 соответственно). Вероятно, в основе полученной нами ассоциации данного полиморфизма -1661A/G лежит увеличение концентрации растворимой формы рецептора CTLA-4.

Изученные полиморфизмы гена *CTLA-4* расположены в одном гене, и это может служить причиной их возможного сцепления. В связи с этим, нами проведен анализ ассоциации с риском развития АИТ носителей различных сочетаний генотипов трех полиморфизмов гена *CTLA-4* (рис. 5).

Из возможных 27 сочетаний, для популяции РТ было выявлено 13, при этом самый высокий риск наблюдается при одновременном присутствии гетерозиготных генотипов по промоторной области и гомозиготного по полиморфному аллелю G экзонной части гена (ОШ=7,87 ДИ 2,03-3,25), а сочетание генотипов по нормальным аллелям гена обладает протективным действием (ОШ= 0,25 ДИ 1,21-1,89)

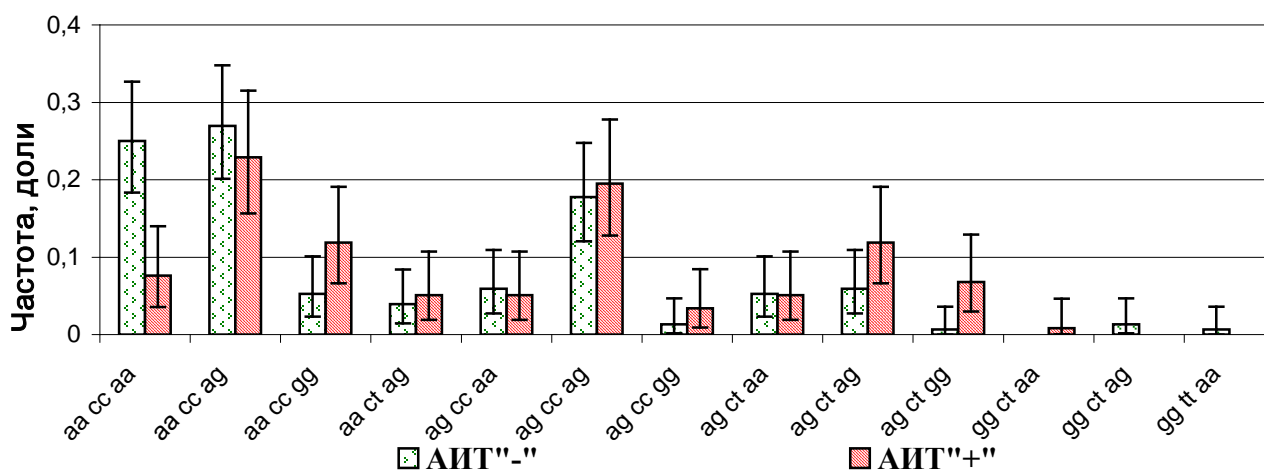


Рис. 5 Распределение частот сочетаний генотипов по полиморфизмам -1661A/G, -318C/T, и +49A/G гена *CTLA-4* в группах больных АИТ (АИТ+) и контроля (АИТ-).

Ген *TNF-α* и его рецепторов *TNF-R1* и *-R2*. Другим геном-кандидатом рассматривается ген *TNF-α*, продукт которого относится к классу противовоспалительных цитокинов, играющих значимую роль в развитии воспалительных реакций, участвующий в активном формировании соединительной ткани и способствующий индукции некроза и апоптоза различных клеток организма.

Известно более 30 полиморфных вариантов гена, но наибольший интерес вызывает полиморфизм -308G/A, локализованный в промоторной области гена. Замена гуанина на аденин в данном случае приводит к повышению экспрессии гена *in vitro* (Bidwell J., 1999).

Нами показано, что аллель G, генотипы GG и AG ассоциированы с повышенным риском развития АИТ (ОШ=3,18, ДИ_{ош} 2,0-4,9; ОШ=10,85, ДИ_{ош} 3,41-34,4; ОШ=3,52, ДИ_{ош} 1,92-6,4 соответственно).

Основной биологический эффект от TNF- α достигается путем связывания его с двумя рецепторами - TNFR1 и TNFR2 - на поверхности клеток (Gupta R., 2007). Потенциальное влияние полиморфизмов генов данных рецепторов обуславливается тем, что они, связываясь с TNF- α , выступают в роли «нейтрализаторов» циркулирующего цитокина (Van Zee K.J., 1992). С другой стороны, TNF-рецепторы могут выступать источником TNF- α , и, как следствие, продлевать его действие (Aderka D., 1992).

Продуктом гена *TNF-R1* является белок-рецептор p55, экспрессирующийся на всех нуклеарных клетках организма и регулирующий каскад регуляторных реакций (Bridjes S., 2002). Одним из наиболее значимых SNP данного гена являются полиморфизмы -609G/T, -1135T/C, влияющие на экспрессию гена.

В ходе исследования, по полиморфизму -1135T/C нами показано достоверное увеличение аллеля C (ОШ=2,84; ДИ_{ош} 1,9-4,05) и гомозиготного генотипа CC (ОШ=5,04; ДИ_{ош} 2,5-9,9) в группе больных АИТ, тогда как аллель T (ОШ=0,35; ДИ_{ош} 0,24-0,5) и генотипы CT и TT оказывают протективное действие в отношении развития АИТ (ОШ=0,25; ДИ_{ош} 0,14-0,44 и ОШ=0,19; ДИ_{ош} 0,1-0,39, соответственно).

TNF-R2 преимущественно экспрессируется на клетках миелоидного происхождения, особенно стимулированных T и B лимфоцитами. На протяжении последних лет проведен целый ряд исследований ассоциации полиморфизмов гена *TNF-R2* с развитием АИТ в различных популяциях, однако эффект от функциональных полиморфизмов, в том числе и от +196T/G экзона 6, не до конца понятен (Bridjes S., 2002). Также, в 5'-нетранслируемом регионе найден инсерционно-делеционный полиморфизм (ins/del) в 15 п.н., локализованный в позиции между -363 и -349. Предположительно, в данном регионе находится сайт связывания фактора транскрипции (Beltinger, 1996).

Сравнительный анализ ассоциации данного полиморфного локуса с риском развития АИТ показал значимые различия только по полиморфизму ins/del 15bp. Так, в группе больных показано увеличение доли гомозиготного генотипа DD на фоне достоверного увеличения гетерозиготного генотипа ID в группе контроля. Таким образом, генотип DD оказывает предрасполагающее, а генотип ID – протективное в

отношении АИТ действие (ОШ=1,41; ДИ_{ош} 0,59-3,36 и ОШ=0,35; ДИ_{ош} 0,19-0,65 соответственно).

Ген *IL-1β*. *IL-1β* – провоспалительный цитокин, инициирующий и регулирующий иммунный ответ, вовлекается в развитие многих аутоиммунных заболеваний, в том числе и тиреопатий (АИТ, болезнь Грейвса (БГ) и др.), поскольку воздействует непосредственно на тиреоидные клетки. Под его контролем находится регуляция экспрессии тиреоид-специфичных белков (тиреоглобулина и тиреопероксидазы) (Kawabe Y., 1989).

Изученный нами полиморфизм +3953С/Т находится в 5 экзоне данного гена, приводит к замене цитозина на тимин в положении +3953 нуклеотидной последовательности.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов по данному полиморфизму показал значимое увеличение доли аллеля С (p=0,0003) и гетерозиготного генотипа СТ (p=0,048) в группе больных АИТ, тогда как в группе условно здоровых лиц наблюдалось достоверное увеличение доли аллеля Т (p=0,0003) и гомозиготного генотипа ТТ (p=4,95·10⁻⁶). Расчет показателей относительного риска показал, что носители генотипа СТ более, чем в 6 раз, подвержены к развитию аутоиммунного поражения ЩЖ (ОШ= 6,05, 95% ДИ_{ош} 2,59-2,97), тогда как генотип ТТ носит протективный характер (ОШ=0,15, 95% ДИ_{ош} 0,06-0,38).

Таким образом, полиморфизмы генов, продукты которых запускают каскад реакций программируемой клеточной гибели (*IL-1β*, *TNF-α*, *TNF-R1* и *TNF-R2*) и нарушения иммунной толерантности (*CTLA-4*), являются генетическими факторами риска развития АИТ у населения РТ.

Поскольку исследованные нами гены вовлечены в регуляцию Т-клеток, которые, в свою очередь стимулируют В-клетки к выработке специфических антител к компонентам ЩЖ (АТ-ТГ и АТ-ТПО) и неспецифических антител к ДНК, в группах больных провели оценку среднего уровня показателей АТ-ТГ и АТ-ТПО, а также уровня АТ к нативной и денатурированной ДНК среди носителей разных генотипов изучаемых полиморфных маркеров (табл. 5).

В ходе исследования показано, что повышение уровня АТ-ТГ (свыше 100 МЕ/мл) наблюдалось у носителей генотипов АG, GГ и генотипа GГ полиморфизмов -1661А/Г и +49А/Г гена *CTLA-4* соответственно, генотипа СС полиморфного локуса -1135Т/С гена *TNFR1* и генотипа ТТ полиморфизма -590С/Т гена *IL-4*. Стоит отметить, что носители генотипа АG полиморфного локуса +49А/Г гена *CTLA-4*; генотипа АА полиморфизма -308А/Г гена *TNF-α* и генотипа ТТ полиморфного варианта +3953С/Т гена *IL-1β* характеризуются нормальными значениями уровня указанных АТ (до 100 МЕ/мл).

Повышение уровня АТ-ТПО более 1000 МЕ/мл отмечалось у носителей гомозиготного по аллелю G генотипа полиморфного локуса -1661A/G гена *CTLA4*; -308A/G гена *TNF- α* ; а также у носителей генотипа II ins/del 15bp гена *TNF-R2* и генотипа CC полиморфизма -1135T/C гена *TNF-R*, в то время как носители гетерозиготных генотипов СТ и ID полиморфных локусов -1135T/C гена *TNF-R1* и del 15bp гена *TNF-R2* соответственно характеризовались выработкой специфичных АТ-ТПО в пределах нормы (до 100 МЕ/мл).

Таблица 5. Генетические маркеры, ассоциированные с повышенной выработкой органоспецифических аутоантител

Полиморфизм	Генотипы	АТ-ТГ, ОШ		АТ-ТПО, ОШ		
		До 100 мЕд/мл (N)	Больше 100 мЕд/мл (выше N)	До 30 мЕд/мл (N)	30-1000 мЕд/мл	Больше 1000 мЕд/мл
-1661A/G гена <i>CTLA-4</i>	AA	0,41	-	-	-	-
	AG	-	1,56	-	-	-
	GG	-	2,54	-	-	3,61
+49A/G гена <i>CTLA-4</i>	AA	-	-	-	-	-
	AG	0,4	-	-	-	-
	GG	-	1,12	-	1,3	-
-308A/G гена <i>TNF-α</i>	AA	0,31	-	-	-	-
	AG	-	-	-	-	-
	GG	-	-	-	1,3	-
-1135T/C гена <i>TNF-R1</i>	CC	-	4,0	-	-	2,35
	CT	-	-	0,33	-	-
	TT	-	-	-	-	-
del15bp гена <i>TNF-R2</i>	II	-	-	-	-	1,03
	ID	-	-	0,23	-	-
	DD	-	-	-	-	-
+3953C/T гена <i>IL-1β</i>	CC	-	-	-	-	-
	CT	-	-	-	-	-
	TT	0,19	-	-	-	-
-590C/T гена <i>IL-4</i>	CC	-	-	-	-	-
	CT	-	-	-	-	-
	TT	-	2,79	-	-	-

Поскольку антитела к ДНК имеют патогенетическое значение, оказывающее повреждающее действие и сопровождающееся развитием типичной воспалительной реакции (Дядык А.И. и др., 2009), а продукты исследованных нами генов участвуют как в ингибировании активации Т-лимфоцитов (*CTLA-4* и *PTPN22*), так и в воспалительных реакциях, нами проведена оценка влияния полиморфных маркеров на уровень выработки АТ к ДНК при АИТ.

В результате исследования значимые различия в уровнях АТ к ДНК между носителями отдельных генотипов обнаружены только по полиморфному маркеру -1661 гена *CTLA4* (рис. 6).

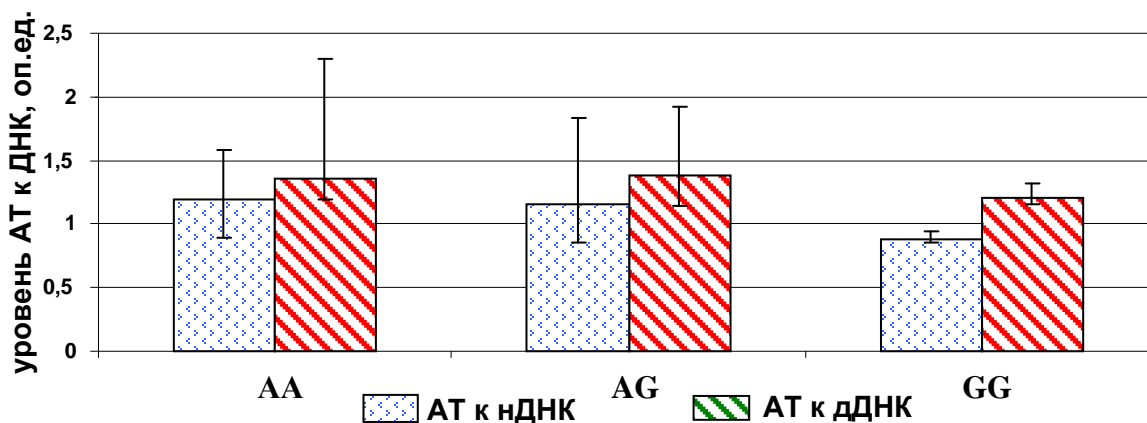


Рис.6. Распределение частот генотипов в группе больных (АИТ⁺⁺) по полиморфному локусу -1661A/G гена *CTLA-4* по уровню содержания АТ к нДНК и дДНК

Как показано на рисунке, у носителей гетерозиготного генотипа GG наблюдается достоверное повышение уровня АТ к дДНК по сравнению с уровнем АТ к нДНК ($p < 0,005$, 95%ДИ 0,06-0,12), несмотря на то, что в целом содержание АТ к ДНК у таких индивидуумов ниже, по сравнению с носителями других генотипов.

Таким образом, в данном исследовании показано, что патогенетическими звеньями иммунологического нарушения хронического лимфоцитарного тиреоидита являются пути индукции программируемой клеточной гибели и генетический фактор, лежащий в основе нарушения регуляции Т-клеток, что, возможно приводит к бесконтрольной выработке не только тиреоидспецифических АТ, но и АТ к ДНК. При этом клиническое проявление АИТ (гипертиреоз, гипотиреоз, эутиреоз) характеризуется наличием разной субстратной специфичности ДНК-абзимов. При хроническом лимфоцитарном превалирующим фактором индукции апоптоза является цитокин TRAIL. Также показано, что значительный вклад в генетическую предрасположенность к данному заболеванию вносят полиморфные варианты -1661A/G и +49A/G гена *CTLA-4*, -308A/G гена *TNF- α* , -1135T/C гена *TNFR1*, del15bp гена *TNFR2*, +3953C/T гена *IL-1 β* .

ВЫВОДЫ

1. При хроническом лимфоцитарном тиреоидите имеет место TRAIL-индуцированный апоптоз, причем в стадии гипертиреоза повышенный уровень TRAIL, *TNF- α* отражают преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами.

2. Хронический лимфоцитарный тиреоидит характеризуется значимым повышением уровня АТ к дДНК. ДНК-гидролизующая активность АТ к ДНК меняется в динамике патологического процесса и влияет на функциональное состояние ЩЖ.

3. Хронический лимфоцитарный тиреоидит характеризуется кластеризацией органоспецифических (АТ-ТГ, АТ-ТПО) и неспецифических (АТ к ДНК) при разной активности аутоиммунного процесса и функционального состояния ЩЖ.

4. Маркерами генетической предрасположенности к развитию АИТ являются полиморфные локусы -1661А/Г и +49 А/Г гена *CTLA-4*; -308А/Г *TNF-α*; *TNFR1* -1135 Т/С, *TNFR2* del 15bp; +3953 С/Т гена *IL-1β*.

5. Уровень АТ (АТ-ТГ, АТ-ТПО и АТ к дДНК) зависит от носительства определенных генотипов полиморфных локусов -1661А/Г, +49 А/Г гена *CTLA4*; -308А/Г гена *TNF-α*; -1135 Т/С гена *TNFR1*; del 15bp гена *TNFR2*; +3953 С/Т гена *IL-1β*; -590С/Т гена *IL-4*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биктагирова, Э.М. Влияние полиморфизмов генов *CTLA-4* и *RTPN22* на риск развития аутоиммунного тиреоидита среди населения Республики Татарстан / Э.М. Биктагирова, О.А. Кравцова, Л.И. Саттарова, Г.Р. Вагапова // СПб РО РААКИ Медицинская иммунология -2010, Т. 12, № 1-2, стр. 103-114

2. Биктагирова, Э.М. Ассоциация полиморфизмов генов *IL-1β*, *IL-4* и *IL-6* с формированием генетической предрасположенности к аутоиммунному тиреоидиту / Э.М. Биктагирова, Л.И. Саттарова, Г.Р. Вагапова, О.А. Кравцова // СПб РО РААКИ Медицинская иммунология -2011, Т. 13, № 6, С.603-608

3. Камалетдинова (Биктагирова), Э.М. Полиморфизм R620W гена *RTPN22* как маркер предрасположенности к аутоиммунному тиреоидиту / Э.М. Камалетдинова (Биктагирова), О.А. Кравцова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского государственного университета 2008 г.: сборник статей / ред. Кондратьева И.Г. - Казанский государственный университет - Казань: Издательство Казанского университета, 2008. – С. 15-17

4. Биктагирова, Э.М. Полиморфизм R620W гена *RTPN22* как маркер предрасположенности к аутоиммунному тиреоидиту среди населения Республики Татарстан / Э.М. Биктагирова, О.А. Кравцова // Симбиоз-2009: материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов (25-29 мая 2009 г. Пермь) / ред. Ившина И.Б., Литвиненко Н.И./ Перм. гос. ун-т. – Пермь. - 2009. – С. 193-194.

5. Biktagirova, E. M. Association of *CTLA4* gene polymorphisms with autoimmune thyroiditis in Tatar population/ E. M. Biktagirova., L.I.Sattarova, O.A. Kravtsova // European journal of human genetics. – June, 2010 – Vol.18, Supp.1. – European Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden – P.220

6. Биктагирова, Э.М. Ассоциация полиморфных локусов генов *CTLA4* и *RTPN22* с риском развития аутоиммунного тиреоидита среди населения Республики

Татарстан/ Э.М. Биктагирова, О.А. Кравцова, Л.И. Сатарова, Г.Р. Вагапова // Материалы научно-практической конференции «Становление и достижения Биохимической школы Казанского университета». – Казань. - 2009. – С.21-22

7. Биктагирова, Э.М. Ассоциация полиморфных вариантов генов цитокинов (TNF-а, IL1b, IL4, IL6), CTLA4 и RTPN22 с риском развития аутоиммунного тиреоидита в популяции Республики Татарстан / Э.М. Биктагирова, О.А. Кравцова, Л.И. Сатарова, Г.Р. Вагапова // Международная научно-практическая конференция «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (17-18 мая). Материалы конференции .– Казань. - 2010., – С.8-13.

8. Биктагирова, Э.М. Влияние полиморфизмов генов CTLA-4 и RTPN22 на риск развития аутоиммунного тиреоидита среди населения Республики Татарстан/ Э.М. Биктагирова, О.А. Кравцова, Л.И. Сатарова, Г.Р. Вагапова // Всероссийский конгресс «Современные технологии в эндокринологии» (тиреодология, нейроэндокринология, эндокринная хирургия) (23-26 ноября, 2009). Сборник тезисов. - Москва - 2009. – С.364.

9. Биктагирова, Э.М. Ассоциация полиморфных вариантов генов цитокинов (TNF-а, IL1b, IL4, IL6), CTLA4 и RTPN22 с риском развития аутоиммунного тиреоидита в популяции Республики Татарстан / Э.М. Биктагирова, Е.В. Вавилова, О.А. Кравцова, Л.И. Сатарова, Г.Р. Вагапова // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им.В.А. Алмазова. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов»(20-22 мая). Под ред. Шляхто Е.В. Санкт-Петербург. - 2010.- №2.– С.30-31

10. Биктагирова, Э.М. Полиморфизм генов TNF-α и его рецепторов как генетический фактор нарушения программируемой клеточной гибели при аутоиммунном тиреоидите / Э.М. Биктагирова, Е.Н. Чухловина, Л.И. Сатарова, Г.Р. Вагапова, З.И. Абрамова, О.А. Кравцова // II Международная научно-практическая конференция «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли». Материалы конференции .Под.ред.Зыятдинова К.Ш.– Казань: ИД «Меддок» - 2011. – С.3-5.

Подписано в печать 19.08.2011. Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 1,5. Договор № 9 от 19.08.2011. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати
Казанского педагогического колледжа
420087, г. Казань, ул. Даурская, дом 30, ком. 49 а.
420036, г. Казань, ул. Побежимова, 47а, тел. 571-14-29.