

ЛИПОПОЛИСАХАРИД-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ МОНОЦИТОВ И ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ДИФфуЗНЫМ ТОКСИЧЕСКИМ ЗОБОМ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С C(-159)T ПОЛИМОРФИЗМОМ CD14 РЕЦЕПТОРОВ МОНОЦИТОВ

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского»,
Россия, Республика Крым, г. Симферополь, б. Ленина, 5/7;
тел. 0502578501. E-mail: rozhkov_alex@inbox.ru*

Целью данной работы явилось изучение липополисахарида (ЛПС) – связывающего потенциала моноцитов и гранулоцитов периферической крови у больных диффузным токсическим зобом (ДТЗ) с различной степенью ответа на эндотоксин (ЭТ) во взаимосвязи с C(-159)T полиморфизмом CD14 рецепторов моноцитов.

Содержание антиэндотоксиновых антител класса G (анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали ЭТ грамотрицательной энтеробактерии *Escherichia coli* K30 (09:K30:P12). ЛПС-связывающий потенциал моноцитов и гранулоцитов периферической крови определяли методом проточной лазерной цитофлуорометрии с помощью проточного лазерного цитофлуориметра PASIII (Partec GmbH, Munster, Германия) и технологии двухцветного иммунофлуоресцентного анализа. C(-159)T полиморфизм гена CD14 рецептора моноцитов определяли с помощью ПЦР. Из исследуемых больных ДТЗ были выделены 3 клинические группы: в первую группу вошли 30 больных гипер- и нормореспондеров, содержащих в 159-м локусе гена CD14 рецепторов моноцитов аллельное сочетание CC; вторую группу составили 36 больных гипер- и нормореспондеров, имеющих в составе гена патологическую аллель T; в третью группу вошли все гипореспондеры (21 человек), у которых в составе изучаемого локуса была аллель T. Для сравнительного анализа полученных результатов обследовано 33 здоровых донора. Было выявлено, что ЛПС-связывающий потенциал на моноцитах в группах больных, содержащих патологическую аллель T, достоверно выше, чем у больных нормо- и гиперреспондеров с генотипом CC и в группе контроля. Таким образом, больные ДТЗ с антительным гипореспондерным ответом на ЭТ и генотипом, содержащим T аллель, более склонны к клеточному гиперреспондерному ответу на ЭТ, что может определять его значительное патологическое влияние на формирование ДТЗ.

Ключевые слова: диффузный токсический зоб, генетический полиморфизм, антитела, рецепторы.

V. A. BELOGLAZOV, U. U. KULAGINA, A. I. GORDIENKO

MONOCYTES AND GRANULOCYTES LIPOPOLYSACCHARIDE-CONNECTING POTENTIAL AT GRAVE'S DISEASE PATIENTS IN INTERRELATION WITH C(-159)T POLYMORPHISM OF CD14 MONOCYTES RECEPTORS

*SE «Crimean state medical university named by S. I. Georgievskiy»,
Russia, Crimean republic, Simferopol, Lenin str., 5/7;
tel. 0502578501. E-mail: rozhkov_alex@inbox.ru*

The aim of this work was studying of monocytes and granulocytes lipopolysaccharide (LPS)-connecting potential at Grave's disease patients with various response type on endotoxin in interrelation with C(-159)T polymorphism of CD14 monocytes receptors.

The antiendotoxin Ig G (anti-ET-IgG) blood concentrations were studied by ELISA for subdivided group patients according antibodies response to ET. The monocytes and granulocytes LPS-connecting potential were assessed by laser double staining flow cytometry. Genetic polymorphism defined by PCR. All patients with GD were divided into three groups. 1st group included 30 patients ET antibodies hyper- and normoresponders with CC allele combination; the 2nd group was made by 36 patients ET antibodies hyper- and normoresponders with pathological T allele; the 3rd group included all ET antibodies hyporesponders (21 patients) who had pathological T allele. 33 healthy donors were investigated too. It was revealed that the monocytes and granulocytes LPS-connecting potential in the group normo-, hyper- and hyporesponders with a genotype, which contains T allele were higher than in group of patients without a mutation and in group of control. Thus patients with hyporesponder response, being

combined with a genotype containing T alel in 159 positions of a gene of CD14 receptor, are more predisposed to endotoxin's pathological action.

Key words: grave's disease, genetic polymorphism, antibodies, receptors.

Введение

На сегодняшний день многие вопросы патогенеза диффузного токсического зоба (ДТЗ) остаются открытыми. Большое внимание учёных привлекает поиск генетических факторов, predisposing к развитию данного заболевания [3, 5]. В настоящее время изучается связь такого генетического полиморфизма гена CD14 рецептора моноцитов, как C(-159)T или C(-260)T с различными заболеваниями. Так, исследования двух групп российских ученых недавно продемонстрировали, что данный полиморфизм липополисахаридного рецептора CD14, возможно, является фактором риска болезни Крона. При наличии T аллели увеличивается экспрессия рецептора CD14, что может способствовать формированию гранулемы. Американская группа учёных доказала, что функциональный полиморфизм C(-260)T в гене CD14 рецептора связан с ишемической болезнью сердца. Была обнаружена высокая частота аллели T(-260) в промоторе гена CD14 рецептора моноцитов у больных с инфарктом миокарда. Исследования немецких коллег показали, что TT-генотип C(-260)T полиморфизма этого гена в популяции Южной Германии ассоциирован с повышенным риском церебральной ишемии (в частности, атеросклеротического инсульта) [7, 8, 9].

В наших предыдущих исследованиях мы изучили C(-159)T полиморфизм гена CD14 рецептора моноцитов у больных ДТЗ и установили, что у здоровых встречаемость аллели T в этом локусе достоверно ($p > 0,95$) ниже, чем у больных. Также было установлено, что у здоровых доноров сочетания СТ и особенно ТТ приводят к достоверному снижению жизнеспособности [2].

Целью данной работы явилось изучение липополисахарида (ЛПС)-связывающего потенциала моноцитов и гранулоцитов периферической крови у больных ДТЗ с различной степенью ответа на ЭТ во взаимосвязи с C(-159)T полиморфизмом CD14 рецепторов моноцитов.

Материалы и методы

Обследована группа из 87 больных ДТЗ в возрастном диапазоне от 22 до 68 лет, находившихся на стационарном лечении в эндокринологическом отделении КРУ «Клиническая больница им. Н. А. Семашко» (г. Симферополь). Диагноз ДТЗ устанавливали на основании клинических данных, лабораторных показателей (уровень ТТГ, тиреоидных гормонов (Т3 и Т4), антитела к ТПО, Ат-рТТГ) и данных инструментального ис-

следования (УЗИ ЩЖ с определением её объёма и оценкой эхоструктуры ткани). Из исследуемых больных ДТЗ были выделены 3 клинические группы: в первую группу вошли 30 больных гипер- и нормореспондеров, содержащих в 159-м локусе гена CD14 рецепторов моноцитов аллельное сочетание CC; вторую группу составили 36 больных гипер- и нормореспондеров, имеющих в составе гена патологическую аллель T; в третью группу вошли все гипореспондеры (21 человек), у которых в составе изучаемого локуса была аллель T.

Для сравнительного анализа полученных результатов обследованы 33 здоровых донора (контрольная группа), достоверно не отличающихся от клинических групп ДТЗ по половому и возрастному распределению.

Содержание антиэндотоксиновых антител класса G определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали ЭТ грамотрицательной энтеробактерии *Escherichia coli* K30 (09:K30:P12), выделенный из бактериальной биомассы методом водно-фенольной экстракции и дополнительно очищенный от примесей РНК обработкой цитавлоном («Serva», Германия) [4]. ЛПС-связывающий потенциал моноцитов и гранулоцитов периферической крови (рецепторы к ЭТ: CD14, TLR-4, рецепторы комплемента (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18), SR рецепторы) определяли методом проточной лазерной цитофлуориметрии с помощью проточного лазерного цитофлуориметра PASIII (Partec GmbH, Munster, Германия) и технологии двухцветного иммунофлуоресцентного анализа. Для сбора и анализа результатов использовали программное обеспечение «Partec FloMax V. 2.4d», а также «WinMDI 2.8» (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA). Для каждого образца регистрировали 10 тысяч клеток, для которых фиксировали параметры переднего (Forward-scattered light, FSC) и бокового (Side-scattered light, SSC) светорассеяния в линейном масштабе, а также интенсивность флуоресценции. Для выявления пула эндотоксин-связывающих рецепторов, находящихся в функционально активном состоянии, в качестве флуоресцентного зонда применяли конъюгат ЭТ *Escherichia coli* K235 с флуоресцеинизотиоцианатом (ET-R). Кластеры моноцитов и гранулоцитов выделяли с помощью функции Polygon gating region по характерным для этих клеточных субпопуляций параметрам переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния [1].

ЛПС-связывающий потенциал на моноцитах и гранулоцитах у больных ДТЗ с различной степенью ответа на ЭТ

Группа	ЕТ-R мон., усл.ед.фл. Me (25%–75%)	ЕТ-R гр., ус.ед.фл. M±m
Гипер-, нормор. СС n=30	2,25 (2,1–2,5)	1,1±0,02
Гипер-, нормор. Т n=36	2,51 (2,4–2,6) p>0,05 p ₁ <0,01	1,15±0,07
Гипор.Т n=21	M=2,4±0,04 p<0,01 p ₁ <0,05	1,17±0,04
Конт. гр. n=33	M=1,7±0,08	1,14±0,05

Примечание: p – достоверность различий с нормой.
p₁ – достоверность различий с группой нормо- и гиперреспондеров с аллелями СС.

Генотипирование аллельных вариантов полиморфного участка гена осуществляли методом аллельной дискриминации с использованием праймеров, способных регистрировать однонуклеотидный аллельный полиморфизм в промоторной области C-159T CD14 рецептора моноцитов. Амплификацию осуществляли путем полимеразной цепной реакции на амплификаторе «Терцик» («ДНК Технология», Россия) с использованием набора реактивов и праймеров «SNP-экспресс» ООО НПФ «Литех» (г. Москва). Результаты амплификации регистрировали с помощью электрофореза в 3%-ном геле агарозы в присутствии бромистого этидия после облучения в ультрафиолетовом свете. Частоты генотипов в группах больных, а также соответствие наблюдаемых распределений генотипов закону Харди-Вайнберга оценивали с использованием метода Пирсона с вычислением величины χ^2 . Статистические расчеты производились с использованием программы «MedStat» (серийный № MS0011) ДНПП ТОВ «Альфа», г. Донецк.

Результаты и их обсуждение

Данные об ЛПС-связывающем потенциале моноцитов и гранулоцитов периферической крови у больных ДТЗ в зависимости от степени ответа на ЭТ и наличия C(-159)T полиморфизма гена CD14 рецепторов моноцитов и здоровых доноров представлены ниже.

При анализе ЛПС-связывающего потенциала моноцитов было выявлено достоверное (p<0,05) увеличение количества данных рецепторов у больных нормо-, гипер- и гипореспондеров с генотипом, содержащим аллель Т, по сравнению с группой больных с сочетанием СС, а в группе гипореспондеров ещё и по сравнению с группой контроля. Достоверных изменений ЛПС-связыва-

ющего потенциала гранулоцитов в исследуемых группах выявлено не было.

Известно, что степень ответа больных на ЭТ кишечной палочки может быть различна. Также согласно данным, изложенным в предыдущих статьях, мы знаем, что пациенты, имеющие гипореспондерный ответ на ЭТ, предрасположены к более тяжелому течению ДТЗ, что выражается у них в повышенном уровне показателей системного воспаления (СРБ) и стимулирующих антител к рецептору ТТГ [2]. Также из результатов наших предыдущих исследований известно, что основными носителями патологической аллели Т среди больных ДТЗ являются люди с гипореспондерным ответом на ЭТ. Данный тип гуморального ответа сочетается с повышением ЛПС-связывающего потенциала на моноцитах периферической крови. Повышение его мы видим и в группе нормо- и гиперреспондеров с аллелью Т. Взаимодействие ЭТ с рецепторами на поверхности клеток является важнейшим фактором, который и определяет результирующий эффект его действия на клеточном уровне. CD14 рецепторы играют решающее значение в распознавании ЭТ. Они, не имея внутрицитоплазматического домена, передают сигнал TLR, преимущественно TLR4 типа. Взаимодействие TLR и их лигандов инициирует активацию сигнальных путей, что приводит к активации генов, ответственных за развитие провоспалительных реакций, таких как ген ФНО α , интерлейкины 1,6,12, NF κ B и др. [6, 7, 9].

Полученные данные позволяют нам выделить группу гипореспондеров как неблагоприятную, т. к. повышенный провоспалительный потенциал на моноцитах у больных данной группы может способствовать стимуляции аутореактивных клеток и усугублению специфического аутоиммунного воспаления при ДТЗ.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

ЛПС-связывающий потенциал моноцитов в группах больных, содержащих патологическую аллель Т, достоверно выше, чем у больных нормо- и гиперреспондеров с генотипом СС и в группе контроля.

Таким образом, больные ДТЗ с антительным гипореспондерным ответом на ЭТ и генотипом, содержащим Т аллель, более склонны к клеточному гиперреспондерному ответу на ЭТ, что может определять его значительное патологическое влияние на формирование ДТЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко А. И. Улучшенный метод получения флуоресцентного зонда для определения липополисахарид-связывающих рецепторов методом проточной лазерной цитофлуориметрии // Таврический медико-биологический вестник. – 2007. – Т. 10. № 4. – С. 156–160.
2. Кулагина Ю. Ю., Малый К. Д. Генетический полиморфизм CD14 рецепторов у больных диффузным токсическим зобом // Иммунология та алергологія. – 2011. – № 4. – С. 23–26.
3. Олійник В. А. Патологія щитовидної залози в Україні (епідеміологія та регіональні особливості) // Журнал практичного лікаря. – 2001. – № 2. – С. 5–7.

4. Пат. 70193 А Україна, МКІ 7 А61К31/01. Спосіб визначення антитіл до діполісахаридів грам-негативних бактерій. Пат. 70193 А Україна, МКІ 7 А61К31/01. А. И. Гордиенко, В. А. Белоглазов; КГМУ им. С. И. Георгиевского; заявл. 29.12.03; опубл. 15.09.04. Бюл. № 9.

5. Симбирцев А. С., Громова А. Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. № 1. – С. 3.

6. Сульская Ю. В. Взаимосвязь между генетическим полиморфизмом Toll-like рецепторов 4-го типа, степенью ответа на эндотоксин кишечной палочки и некоторыми иммунологическими показателями у больных сахарным диабетом 2-го типа // Оригинальные исследования. – 2011. – № 1 (33). – С. 72–24.

7. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159T with allergic rhinitis // Am. j. rhinol. allergy. – 2010. – № 24. – P. 3.

8. Kurne A. Lack of association of the CD14/C – 159T polymorphism with susceptibility and progression parameters in Turkish multiple sclerosis patients / A. Kurne, G. Sayat, O. F. Aydin // J. neuroimmunol. – 2012. – № 250 (1–2). – P. 83–86.

9. Liu X. Q., Yang J. Y. The association between C-159T polymorphism in promoter region of CD 14 polymorphism and coronary heart disease // Yi Xue Xin Zhi Za Zhi. – 2010. – № 20. – P. 427–429.

Поступила 20.05.2014

В. С. БОТАШЕВА, Н. А. СТАДНИК

ПОКАЗАТЕЛИ ОБЛАСТЕЙ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ ГЕПАТОЦИТОВ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

Кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310; тел. 89624009040. E-mail: sna1@bk.ru

На лабораторных животных получена экспериментальная модель тиреотоксикоза. Работа выполнена на 46 белых крысах-самцах линии Вистар массой тела 250–300 г. Лабораторным животным ежедневно вводили L-тироксин в дозе 1,6 мг на 1 кг массы тела. Крыс выводили из опыта через 7, 14, 21, 28, 45, 60 и 90 суток. Для определения уровня тиреоидных гормонов проводили забор крови из хвостовой вены. Проведено макроскопическое и микроскопическое исследование печени. Результаты экспериментального исследования показали, что при ежедневном введении L-тироксина наблюдаются увеличение уровня тиреоидных гормонов (Т4, Т3) в крови и уменьшение тиреотропного гормона (ТТГ). При гистологическом исследовании в печени выявлены диффузная гидropическая и баллонная дистрофия гепатоцитов, участки колликвационного некроза с формированием полостей, диффузный перисинусоидальный отек, лимфоцитарная инфильтрация. При окраске азотно-кислым серебром выявлены ядрышковые организаторы. Отмечаются увеличение количества областей ядрышковых организаторов при экспериментальном тиреотоксикозе на 28-е сутки и постепенное уменьшение их к концу эксперимента.

Ключевые слова: щитовидная железа, тиреотоксикоз, печень, гидropическая дистрофия, перисинусоидальный отек, области ядрышковых организаторов гепатоцитов.

V. S. BOTASHEVA, N. A. STADNYK

NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS INDICATORS HEPATOCYTES
IN EXPERIMENTAL THYROTOXICOSIS