

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В работе изучена ДНКазная, БАПНА-амидазная и пероксидазная активность препаратов IgG, выделенных у больных с заболеваниями щитовидной железы. Уровень абзимной активности при изученной патологии оказался достоверно более высоким в сравнении с контрольной группой доноров крови ($p < 0,001$). Также обнаружена корреляция между абзимной активностью и некоторыми клинико-лабораторными показателями данных заболеваний.

Полученные нами данные подтверждают возможность участия абзимов в патогенезе аутоиммунных болезней щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: заболевания щитовидной железы, абзимная активность IgG.

Complex analysis of different catalytic IGG activity variants in thyroid gland diseases

E.V. SIDORSKAIA, I.I. GENERALOV, A.N. OKOROKOV
Vitebsk State Medical University

We examined DNase BAPNA-amidase and peroxidase activity in patients with different thyroid pathology. The absolute levels of these variants of abzyme activity in thyroid diseases were increased in comparison with the same ones in healthy donors ($p < 0,001$).

We revealed the correlation between abzyme activities and several clinical manifestations of thyroid pathology and laboratory findings of studied diseases.

Our data confirm that catalytic antibodies can participate directly in the pathogenesis of the thyroid autoimmune diseases.

KEY WORDS: thyroid gland diseases, abzyme IgG activity.

На сегодняшний день патогенез аутоиммунных заболеваний щитовидной железы остается одной из важных проблем тиреологии. Известно, что аутоиммунные тиреопатии, к которым относят диффузный токсический зоб, хронический лимфоцитарный тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреогенную офтальмопатию и др., рассматривают как органоспецифические заболевания, сопровождающиеся неконтролируемой продукцией аутоантител.

Роль аутоантител при данных заболеваниях считается бесспорной, причем наибольшее значение отводят антителам к тиреоглобулину и тиреопероксидазе. Антитиреоглобулиновые антитела обнаруживаются у 89,9% больных аутоиммунным тиреоидитом. Обнаружена способность антитиреоглобулиновых антител пе-

рекрестно реагировать с тиреопероксидазой (6, 9). Установлено, что такие антитела обладают протеолитической активностью и расщепляют тиреоглобулин на мелкие фрагменты (10). Также было доказано наличие антител, биспецифичных к тиреоглобулину и тиреопероксидазе при аутоиммунном тиреоидите, причем их количество снижалось после терапии тироксином (9). Антитела к тиреопероксидазе способны разрушать тиреоциты как через фиксацию комплемента с последующим цитотоксическим воздействием на клетки щитовидной железы, так и посредством прямого взаимодействия с тиреоцитами.

Таким образом, патогенетическая роль аутоантител в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы является доказанной. В связи с этим возникает

вопрос об изучении при данных заболеваниях антител, обладающих каталитической активностью, которая претерпевает значительные изменения при аутоиммунной патологии (7).

Сведения о существовании антител, обладающих каталитическими свойствами, появились в конце 60-х годов (2, 11). Первое целенаправленное получение моноклональных каталитических антител (абзимов) было осуществлено в 1986 году Р. Schultz с соавт. Спектр катализируемых антителами реакций чрезвычайно разнообразен (протеолиз, оксидоредуктазная активность, ДНКазная активность, РНКазная активность, протеинкиназная активность (2).

Изучены отдельные виды каталитической активности иммуноглобулинов при заболеваниях щитовидной железы. В частности, при аутоиммунном тиреоидите показано наличие ДНКазной и РНКазной активности (8). При аутоиммунном тиреоидите обнаружены антитела, гидролизующие протеины, тиреоглобулин и метилкумаринамид (11).

Несмотря на все вышеизложенное, комплексная оценка различных вариантов каталитической активности IgG при патологии щитовидной железы не производилась. Это и стало целью нашей работы.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовались сыворотки крови и препараты IgG, выделенные из данных сывороток комбинированным методом. Очистку и контроль чистоты полученных иммуноглобулинов (ИГ) проводили как описано в (1, 3, 5). Концентрацию IgG в сыворотках определяли по методу Манчини (4).

Всего обследовано 136 человек, из них больных диффузным токсическим зобом 34 человека, аутоиммунным тиреоидитом 36 человек, сочетанием аутоиммунного тиреоидита с диффузным токсическим зобом 20 человек, подострым тиреоидитом (16 человек), узловым токсическим зобом (13 человек), раком щитовидной железы (17 больных). Контрольную группу составили доноры областной станции переливания крови (69 человек).

В группе больных диффузным токсическим зобом женщин было 28, мужчин – 6. У 10 больных диагноз был выставлен впервые. Тяжелый тиреотоксикоз был диагностирован у 6 больных, средней степени тяжести – у 21, легкий – у 4 пациентов. 3 человека находились в состоянии эутиреоза на фоне проводимой медикаментозной тиреостатической терапии. Аутоиммунная офтальмопатия 1 степени была диагностирована у 6 больных, 2 степени – у 3 больных. Тиреостатическую терапию мерказолилом в дозе от 0.015 г до 0.04 г назначали 30 больным.

В группе больных аутоиммунным тиреоидитом женщин было 31, мужчин – 5. У 9 пациентов аутоиммунный тиреоидит был диагностирован впервые. У шести человек возник рецидив заболевания после проводимого консервативного, а затем оперативного лечения (больным была выполнена операция струмэктомии). У 28 больных заболевание определялось как первичное. 28 человек имели гипертрофическую форму, 8 человек – атрофическую форму аутоиммунного тиреоидита. Состояние гипотиреоза было диагностировано у 9 пациентов, из них гипотиреоз средней степени тяжести – у 8, тяжелый – у 1 больного. У 27 больных диагностировано эутиреоидное состояние. Терапия L-тироксина от 25 до 300 мкг в сутки назначалась 29 пациентам.

В группу больных сочетанием аутоиммунного тиреоидита и диффузного токсического зоба были включены 28 женщин и 2 мужчин. Легкий тиреотоксикоз демонстрировали 6 больных, средней тяжести – 5, тяжелой – 6 пациентов. В состоянии эутиреоза находились 6 человек. Аутоиммунная офтальмопатия была диагностирована у 6 пациентов. 17 человек получали мерказолил в дозе от 0,015 до 0,04 г.

В группу больных подострым тиреоидитом были включены 15 женщин и 1 мужчина. У 14 пациентов диагноз был выставлен впервые, у 2 больных был диагностирован рецидив заболевания. Всем наблюдаемым в условиях стационара больным назначались глюкокортикостероиды в дозе от 15 до 30 мг в сутки с последующим снижением дозы по схеме с индивидуальным подходом к каждому больному.

В группе больных узловым токсическим зобом тиреотоксикоз легкой степени был диагностирован у 3 человек, средней – у 4, тяжелой – у 3 больных. В состоянии эутиреоза на фоне медикаментозной терапии находились 3 человека. Тиреостатическая терапия мерказолилом в дозе от 20 до 40 мкг в сутки была назначена 11 больным.

Группу больных раком щитовидной железы составили 12 женщин и 5 мужчин. У 16 пациентов из числа обследованных в анамнезе имелись указания на заболевание щитовидной железы. Гистологически папиллярная форма рака выявлена у 14, фолликулярная у 1, папиллярно-фолликулярная также у 1 больного. Все пациенты имели 1 стадию рака щитовидной железы. По международной классификации (TNM) T1 демонстрировали 12 человек, T2 – 4, T3 – 1 больной. Поражения регионарных лимфоузлов, а также отдаленных метастазов ни у одного больного выявлено не было. Всем больным выполнена операция тиреоидэктомии.

У этих больных и доноров изучали ДНКазную, БАПНА-амидазную и пероксидазную активности препаратов выделенных IgG. ДНКазную и БАПНА-амидазную активность оценивали, как описано в (1, 3). Определение пероксидазной активности ИГ модифицировали следующим образом: пробы содержали 40 мкл образца ИГ, 60 мкл физиологического раствора и 100 мкл индикаторной смеси, состоящей из 24 мг о-фенилендиамина и 27 мг гидроперита, растворенных в 15 мл 0.05M трис-HCl буферного раствора pH 7,4. Инкубировали при 37° С в течение 4 часов. Учет проводили на мультискане АИФ-Ц-01С (методика №11). Полученные единицы оптической плотности приводили к единой концентрации IgG (1 мг/мл) и далее выражали в единицах активности по стандартной пероксидазе хрена ("Reanal"), 1 мг которой соответствует 350 Ед активности.

Результаты и обсуждение

При диффузном токсическом зобе, аутоиммунном тиреоидите, сочетании диффузного токсического зоба и аутоиммунного тиреоидита, при подостром тиреоидите, узловом токсическом зобе, раке щитовидной железы уровни ДНКазной активности ИГ на 1 мг антител и на 1 мл сыворотки крови превышали аналогичные показатели группы здоровых доноров ($p < 0,001$). Уровни БАПНА-амидазной активности антител в изучаемых группах также достоверно отличались от контрольных значений во всех вариантах оценки. Пероксидазная активность на 1 мг IgG больных достоверно превышала донорские уровни ($p < 0,05$), однако достоверно не отличалась при пересчете на сывороточную концентрацию IgG. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Уровни абзимной активности IgG при изучаемых заболеваниях

Группы обследованных больных	ДНКазная активность			БАПНА-амидазная активность			Пероксидазная активность		
	Ек-Ео/Ек *100%	ЕД/ 1 mg IgG	ЕД / 1 мл сыворотки	Ео-Ек	пКат/ 1 mg IgG	пКат на 1 мл сыворотки	Ео-Ек	ЕД/ 1 mg IgG	ЕД на 1 мл сыворотки
Заболевания щитовидной железы в целом n=136	34,2±2,0	0,044±0,007	0,54±0,02	0,065±0,0051	0,74±0,06	9,2±0,8	0,02±0,0013	0,02±0,0002	0,25±0,009
Диффузный токсический зоб n=34	28,1±2,7	0,042±0,0014	0,56±0,05	0,047±0,007	0,54±0,08	6,7±1,1	0,024±0,003	0,018±0,0001	0,24±0,01
Аутоиммунный тиреоидит n=36	53,5±4,6	0,05±0,00145	0,65±0,04	0,097±0,013	1,09±0,15	14±2,1	0,026±0,0064	0,023±0,0019	0,3±0,03
Аутоиммунный тиреоидит в сочетании с диффузным токсическим зобом n=20	36,3±5,3	0,045±0,0018	0,51±0,05	0,066±0,012	0,75±0,14	8,5±2,1	0,018±0,003	0,0195±0,0003	0,22±0,021
Подострый тиреоидит n=16	22,2±3,6	0,038±0,0024	0,4±0,04	0,0562±0,013	0,65±0,14	7,4±1,9	0,018±0,0029	0,02±0,0003	0,225±0,03
Узловой токсический зоб n=13	32,3±4,1	0,44±0,002	0,58±0,056	0,064±0,014	0,73±0,16	8,5±2,0	0,019±0,006	0,02±0,0005	0,265±0,028
Рак щитовидной железы n=17	17,1±1,8	0,0375±0,001	0,42±0,06	0,031±0,0026	0,378±0,03	3,9±0,4	0,028±0,0032	0,02±0,0003	0,225±0,025
Доноры крови	7,8±0,9 n=55	0,027±0,0015 n=55	0,25±0,029 n=49	0,005±0,0006 n=51	0,08±0,01 n=51	0,8±0,1 n=43	0,005±0,001 n=38	0,018±0,0001 n=43	0,19±0,019 n=43

При оценке уровней ДНКазной и БАПНА-амидазной активностей сывороток крови при данных заболеваниях оказалось, что уровни ДНКазной активности сывороток при патологии щитовидной железы в целом и по отдельным нозологиям статистически достоверно превышают таковые в группе доноров ($p < 0,05$), однако достоверной разницы между сывороточной ДНКазной активностью в группах больных с различными заболеваниями щитовидной железы выявлено не было.

При оценке уровней сывороточной БАПНА-амидазы оказалось, что статистически достоверно превышает значения донорской группы лишь активность сывороток в группе больных аутоиммунным тиреоидитом в сочетании с диффузным токсическим зобом ($p < 0,05$). В остальных группах разница была недостоверна.

При проведении анализа в группе больных заболеваниями щитовидной железы обнаружены корреляции между величинами каталитической активности изученных препаратов и клиническими признаками заболеваний. Например, выявлена связь между уровнем БАПНА-амидазной активности IgG и продолжительностью болезни ($r=0,63$; $p=0,00001$; $n=94$) во всей группе больных с патологией щитовидной железы. При узловом токсическом зобе показана взаимосвязь между сывороточной ДНКазной активностью и тяжестью тиреотоксикоза ($r=0,63$; $p=0,02$; $n=13$). Больные подострым тиреоидитом демонстрировали обратную корреляцию БАПНА-амидазной активности антител с возрастом пациентов ($r=-0,62$; $p=0,0098$; $n=16$). В этой же группе величина объема щитовидной железы (по данным УЗИ) коррелировала с сывороточной ДНКазной активностью ($r=0,52$; $p=0,0447$; $n=15$) и БАПНА-амидазной активностью антител ($r=0,5$; $p=0,05$; $n=15$). В группе больных раком щитовидной железы ДНКазная активность ИГ также коррелирует с возрастом ($r=0,49$; $p=0,046$; $n=17$).

Определяется также связь уровней активности и лабораторных признаков изучаемых заболеваний. В частности, в группе больных сочетанием аутоиммунного тиреоидита с диффузным токсическим зобом, вы-

явлена зависимость между ДНКазной активностью антител в 1 мл сыворотки крови и количеством антиреоглобулиновых антител ($r=0,57$; $p=0,017$; $n=17$). При подостром тиреоидите существует зависимость между абсолютным уровнем сывороточной БАПНА-амидазной активности и содержанием Т3 ($r=0,63$; $p=0,02$; $n=13$). При раке щитовидной железы показана связь между абсолютным уровнем сывороточной БАПНА-амидазной активности и лейкоцитозом ($r=0,65$; $p=0,0206$; $n=16$). При диффузном токсическом зобе обращает на себя внимание обратная корреляция между пероксидазной активностью иммуноглобулинов и уровнем тиреоидных гормонов: Т3 ($r=-0,6$; $p=0,0006$; $n=30$) и Т4 ($r=-0,53$; $p=0,0025$; $n=30$). Наконец, в некоторых группах определяется взаимосвязь видов активности ИГ между собой. И если при диффузном токсическом зобе определялась положительная связь между ДНКазной и БАПНА-амидазной активностью ИГ ($r=0,49$; $p=0,0036$; $n=34$), то при подостром тиреоидите была выявлена высокая обратная корреляция этих показателей ($r=-0,78$; $p=0,0003$; $n=16$).

Анализируя полученные результаты, мы приходим к следующему заключению.

При заболеваниях щитовидной железы в организме больных циркулируют антитела, проявляющие ДНКазную, БАПНА-амидазную (протеолитическую) и пероксидазную активность. Наибольшие уровни всех изучаемых видов активности выявляются при аутоиммунном тиреоидите, несколько меньшие при сочетании аутоиммунного тиреоидита с диффузным токсическим зобом, а также при диффузном и узловом токсическом зобе, подостром тиреоидите, а наименьшие величины определяются при раке щитовидной железы.

Результаты проведенного статистического анализа свидетельствуют, что уровни каталитической активности ИГ коррелируют с клиническими и лабораторными проявлениями заболеваний щитовидной железы. Тем самым подобные антитела могут участвовать в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, оказывая дополнительное деструктивное воздействие на тиреоидную ткань.

Литература

1. Генералов И.И., Новиков Д.К. Изменение амидазной активности препаратов IgG у больных бронхиальной астмой до и после специфической иммунотерапии. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 1999. - №1. - С. 119-125.
2. Генералов И.И., Новиков Д.К. Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение // Усп. совр. биол. - 1998. - Т.118, вып.2. - С.178-193.
3. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой // Иммунология. - 1998. - №3. - С.54-56.
4. Иммунологические методы: Пер. с нем./Под ред. Г Фримеля. - М., 1987.

5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981.
6. Петунина Н.А., Герасимов.Г.А. Аутоиммунный тиреодит.// Проблемы эндокринологии.-1997.-№4.-Т.43.- С.24-27.
7. Generalov I.I., Sidorskaya E.V. Abzyme activity in SLE and RA. //Immunol.Lett.-Vol.56.-№1-3.-P.309-310.
8. Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V. et al. Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab-fragment: application of the flow linear dichroism technique. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA.-1995.-Vol.92.-P.254-257.
9. Knobel M., Barka M. et al. Prevalence of antithyroid peroxidase antibodies in autoimmune and nonautoimmune thyroid disorders. //J.Endocrinol.Invest.-1994.-Vol.17.-№11.-P.837-842.
10. Li L., Paul S., Tyutyulkova S.,et al. Catalytic activity of antithyroglobulin antibodies. //J. Immunol.-1997.-Vol.154.-№7.-P.3328-3332.
11. Tramontano A., Janda K.D., Lerner. Catalytic antibodies. //Science.-1986.-Vol.234.-P.1566-1569.