

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.441-006.5-06:616.441-008.61]-092-078.33

Л. В. Васина, В. Ф. Митрейкин, Н. Н. Петрищев

ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ДИФфуЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ЗОБЕ

Кафедра патофизиологии (зав. — проф. Н. Н. Петрищев) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, ЦМСЧ № 122 (зав. — проф. Я. А. Накатис)

Проведены исследования изменения функциональной активности и повреждения эндотелия 38 больных при ДТЗ на фоне тиреотоксикоза. Отмечалось увеличение соотношения CD4/CD8 и количества клеток, несущих CD4⁺ и HLA-DR⁺. Содержание в крови ФНО α и ИЛ-8 при тиреотоксикозе также было достоверно выше, чем в периоде ремиссии. Установлены сильная корреляционная зависимость между уровнем тиреоидных гормонов и повышением в крови содержания PAI-1 и отрицательная корреляционная связь с содержанием PAI-1, свидетельствующие о повышении фибринолитического потенциала крови. Наблюдалось существенное увеличение количества циркулирующих эндотелиоцитов у больных при гипертиреозе, связанное с усилением повреждения эндотелиальных клеток в результате развития иммунопатологических изменений и повышения содержания тиреоидных гормонов в крови. Изменение уровня t-PA, PAI-1 и циркулирующих эндотелиоцитов в крови могут быть использованы в качестве маркеров выраженности повреждения эндотелия, в характеристике активности иммунопатологического процесса и прогнозировании развития сосудистых осложнений при ДТЗ.

Changes in endothelial functional activity and lesion were studied in 38 patients with diffuse toxic goiter (DTG) in the presence of thyrotoxicosis. There was an increase in CD4/CD8 ratios and the count of cells carrying CD4⁺ and HLA-DR⁺. The blood levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-8 were also significantly higher in thyrotoxicosis than those at remission. There was a significant correlation between the blood levels of thyroid hormones and the higher blood concentration of PAI-1 and a negative correlation with the content of PAI-1, which is indicative of an increase in the blood fibrinolytic potential. There was a considerable rise in the count of circulating endotheliocytes in hyperthyroidism, which was associated with enhanced endotheliocytic lesion due to the development of immunopathological changes and to the higher blood levels of thyroid hormones. The changes in the blood levels of t-PA, PAI-1, and circulating endotheliocytes may be used as markers of the severity of endothelial lesion, in characterizing the activity of an immunopathological process, and in predicting the development of vascular diseases in DTG.

Диффузный токсический зоб (ДТЗ, болезнь Грейвса) является одним из наиболее распространенных заболеваний щитовидной железы, сопровождающихся повышенной продукцией тиреоидных гормонов [10]. В настоящее время ДТЗ рассматривается как генетическое аутоиммунное заболевание, поскольку во всех процессах инициации и поддержания аутоиммунной агрессии непосредственное участие принимают HLA-молекулы, преимущественно II класса [8]. Возникновение ДТЗ может быть обусловлено генетическими дефектами, нарушением антигенраспознающей функции иммунокомпетентных клеток, изменением тиреоидного эпителия и экспрессией на его поверхности антигенов II класса HLA, что приводит к аутоиммунному повреждению ткани щитовидной железы [1].

Иммунологические нарушения у больных ДТЗ наблюдаются одновременно с развитием гемодинамических и сосудистых расстройств, что позволяет высказать предположение о важной роли функциональных изменений сосудистого эндотелия в патогенезе заболевания. В последние годы для определения функциональной активности эндотелиоцитов при сосудистой патологии проводится исследование тромборегуляторов эндотелиального происхождения, в том числе тканевого активатора плазминогена (t-PA), его специфического ингибитора (PAI-1), а также количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток [3].

Целью работы явилось изучение влияния иммунокомпетентных клеток и цитокинов фактора некроза опухоли α — ФНО α , интерлейкина (ИЛ-8 и

ИЛ-1) на функциональную активность эндотелия при ДТЗ на фоне тиреотоксикоза.

Материалы и методы

Обследованы 38 женщин (средний возраст $38,6 \pm 4,1$ года), страдающих ДТЗ, из которых у 26 определялся тиреотоксикоз, а 12 находились в ремиссии (состояние эутиреоза сохранялось в течение 1 года после отмены тиреостатической терапии). Диагноз верифицирован на основании клинических и лабораторных данных. До начала лечения проведено обследование 26 больных с длительностью заболевания 3–6 мес, что позволяло исключить иммуносупрессивное действие анти тиреоидных препаратов. Всех больных обследовали с целью исключения сопутствующих бактериальных и вирусных инфекций, влияющих на уровень цитокинов в сыворотке крови.

Трийодтиронин (Т₃), тироксин (Т₄), тиреотропный гормон (ТТГ) и аутоантитела к тиреоглобулину определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом анализаторе ES-300 фирмы "Boehringer Mannheim" (Австрия). Использовали тест-системы этой же фирмы. Содержание t-PA в плазме устанавливали с помощью твердофазного ИФА с тест-системами фирмы "Diagnostic Stago" (Франция).

Для оценки уровня ингибитора активатора плазминогена использовали колориметрический тест с применением хромогенного субстрата (набор PAI chromogenic, фирма "Diagnostika Stago", Франция). Принцип метода основан на образовании PAI-1,

содержащегося в испытуемой плазме крови, комплекса с добавляемой урокиназой и уменьшении превращения плазминогена в плазмин. Количество образующегося плазмينا обратно пропорционально уровню PAI-1 в испытуемой плазме.

Циркулирующие эндотелиоциты в крови вместе с тромбоцитами выделяли центрифугированием 1000 об/мин в течение 10 мин с последующим осаждением кровяных пластинок с помощью аденозиндифосфата. Количество клеток эндотелия подсчитывали в двух сетках камеры Горяева методом фазово-контрастной микроскопии [7]. Концентрацию цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8 и ФНО α) в сыворотке определяли методом ИФА с использованием отечественных моноклональных антител (НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург).

Для оценки гетерогенности популяций лимфоидных клеток по экспрессируемым маркерам клеточной поверхности использовали моноклональные антитела серии DACO (Дания).

Для статистической обработки данных использовали *t*-тест Стьюдента и расчет коэффициента корреляции Пирсона (*r*). Данные представлены в виде $X \pm x$, где X — среднее арифметическое, а x — стандартная ошибка средней.

Результаты и их обсуждение

При сравнении показателей клеточного иммунитета первичных больных и в периоде ремиссии заболевания (табл. 1) статистически значимые различия установлены в содержании клеток, несущих CD4 $^{+}$ и HLA-DR $^{+}$, уровень которых был повышен на фоне тиреотоксикоза, а также отмечалось увеличение соотношения CD4/CD8, в то время как в субпопуляции лимфоцитов с кластерами дифференцировки CD3, CD8, CD20, CD16 изменений не наблюдалось.

Следовательно, результаты анализа субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток свидетельствуют о повышении иммунологической реактивности при тиреотоксикозе, которое проявляется увеличением Т-хелперов (CD4 $^{+}$), изменением соотношения CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ и возрастанием HLA-DR $^{+}$ — показателя активности Т- и В-клеток. Изменение содержания CD4 $^{+}$ и соотношения CD4 $^{+}$ /

Таблица 1

Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток больных ДТЗ

Лимфоциты	Больные ДТЗ	
	первичные (<i>n</i> = 26)	ремиссия (<i>n</i> = 12)
Т-клетки (CD3 $^{+}$), %	64,9 $\pm$ 6,2	68,2 $\pm$ 5,4
Т-хелперы (CD4 $^{+}$), %	58,4 $\pm$ 4,4	44,3 $\pm$ 4,6*
CTL (CD8 $^{+}$), %	23,7 $\pm$ 3,3	22,9 $\pm$ 4,3
CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$	2,46	1,93*
В-клетки (CD20 $^{+}$), %	11,6 $\pm$ 4,9	12,8 $\pm$ 4,1
NK-клетки (CD16 $^{+}$), %	10,4 $\pm$ 5,6	10,8 $\pm$ 5,9
Активированные Т- и В-клетки (HLA-DR $^{+}$), %	30,2 $\pm$ 5,9	17,9 $\pm$ 4,1*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * — $p < 0,05$.

Таблица 2

Изменение содержания цитокинов ФНО α , ИЛ-1 и ИЛ-8 в сыворотке крови больных ДТЗ

Цитокины	Больные ДТЗ	
	первичные (<i>n</i> = 26)	ремиссия (<i>n</i> = 12)
ФНО α , пкг/мл	93,3 $\pm$ 15,9	43,3 $\pm$ 12,5*
ИЛ-1, пкг/мл	9,0 $\pm$ 2,4	7,9 $\pm$ 3,1
ИЛ-8, пкг/мл	85,1 $\pm$ 12,8	32,3 $\pm$ 11,8*

CD8 $^{+}$, вероятно, влияют на процессы апоптоза при ДТЗ, так как именно эти клетки представляют собой основу антигензависимой запрограммированной гибели клеток [5, 12].

Об активации иммунной системы при ДТЗ также свидетельствует повышение спонтанной продукции некоторых цитокинов (табл. 2).

Содержание ФНО α и ИЛ-8 при тиреотоксикозе было статистически значительно выше, чем в периоде ремиссии заболевания, в то же время различий в уровне ИЛ-1 в сыворотке крови не выявлено. Исследуемые цитокины являются участниками клеточно-опосредованных иммунных реакций. ФНО α путем запуска каскада реакций фрагментации ДНК способствует апоптозу, активирует эндотелиоциты и на их поверхности вызывает экспрессию молекул адгезии и совместно с ИЛ-1 может быть причиной повреждения эндотелия [4, 12]. Между содержанием в крови ФНО α и уровнем антител к тиреоглобулину установлена положительная корреляция ($r = 0,61$, $p < 0,01$), которая является подтверждением участия туморнекротического фактора в механизме повреждения ткани щитовидной железы. При анализе динамики изменения содержания активированных лимфоцитов, несущих HLA-DR $^{+}$ и ИЛ-8, мишенями которого являются Т- и В-клетки, отмечена положительная корреляционная зависимость ($r = 0,51$, $p < 0,05$), также свидетельствующая о цитокиновом механизме регуляции иммунологических реакций при ДТЗ.

Длительное воздействие циркулирующих в крови избыточных концентраций тиреоидных гормонов, активированных Т- и В-лимфоцитов, ФНО α , ИЛ-8 на эндотелий сосудов — их специфическую мишень в реакциях межклеточного взаимодействия [6, 12], может быть причиной не только повы-

Таблица 3

Изменение содержания t-PA, PAI-1 и циркулирующих эндотелиоцитов при ДТЗ

Больные ДТЗ	Маркеры повреждения эндотелия		
	PAI-1, до 10 ед/мл	t-PA, 1—12 нг/мл	циркулирующие эндотелиоциты, 1,5 $\pm$ 0,6 клетки на счетную камеру
Первичные (гипертиреоз) (<i>n</i> = 26)	0,76 $\pm$ 0,08	21,3 $\pm$ 2,0	10,3 $\pm$ 3,12
Ремиссия (эутиреоз) (<i>n</i> = 12)	5,9 $\pm$ 0,8**	14,7 $\pm$ 1,3*	2,1 $\pm$ 0,92**

Примечание. ** — $p < 0,01$.

шения метаболической и функциональной активности, но и повреждения эндотелиоцитов. Как показали исследования образующихся в эндотелии и выделяемых в кровь t-PA и PAI-1, происходит значительное изменение их содержания при ДТЗ (табл. 3). Последующий анализ выявил сильную корреляционную зависимость ($r = 0,94$) между уровнем тиреоидных гормонов и повышением в крови содержания t-PA и значительную отрицательную корреляционную связь с содержанием PAI-1 ($r = -0,52$). Нарушение гемостатического баланса в сторону увеличения выработки t-PA, по-видимому, является одной из причин повышения фибринолитического потенциала крови при ДТЗ.

Существенное увеличение количества циркулирующих эндотелиоцитов у больных при гипертиреозе по сравнению с периодом ремиссии ($p < 0,01$) свидетельствует об усилении повреждения эндотелиальных клеток при повышении содержания тиреоидных гормонов в крови. В то же время наличие положительной корреляционной связи между уровнем антител к тиреоглобулину и содержанием эндотелиальных клеток в крови ($r = 0,46$, $p < 0,05$) также указывает на участие иммунологических механизмов в деструкции эндотелиального слоя сосудистой стенки.

Следовательно, взаимодействие с внутренней стенкой сосудов активированных Т- и В-клеток, избыточного количества тиреоидных гормонов, а также ИЛ-8 и ФНО α , мишенью для которых являются эндотелиальные клетки, приводит к стимуляции эндотелия, увеличению образования t-PA и уменьшению содержания PAI-1 и последующему повреждению эндотелиального пласта, которое происходит, вероятно, при непосредственном участии ФНО α , индуцирующего апоптоз, и сопровождается увеличением в крови количества эндотелиальных клеток, что позволяет t-PA, PAI-1 и циркулирующие в крови эндотелиоциты считать маркерами повреждения эндотелия при ДТЗ.

Протеолитическая система плазминоген—t-PA—PAI-1—плазмин имеет важное значение не только в регуляции системы фибринолиза, но и вовлекается во многие физиологические и патологические процессы. При ряде аутоиммунных заболеваний происходит быстрое снижение протеолитической сывороточной активности, которое сопровождается изменением отдельных компонентов иммунной системы и увеличением продукции цитокинов и адгезивных молекул, определяющих динамику заболевания [13—15]. ФНО α , как известно, участвует в обеспечении адгезии лимфоцитов к эндотелиальным клеткам за счет повышения экспрессии на эндотелии адгезивных молекул ICAM-1 и на лимфоцитах интегрина LFA-1 [4, 5, 7]. Повышение в сыворотке больных с тиреотоксикозом цитокинов ФНО α и ИЛ-8 и выявленная корреляционная зависимость между активированными лимфоцитами и уровнем цитокинов свидетельствуют о выраженной иммунологической активности, приводящей к взаимодействию лимфоцитов с эндотелиальными клетками за счет усиления поверхностной экспрессии на эндотелиоцитах молекул

межклеточной адгезии и к лимфоидной инфильтрации щитовидной железы [4]. При участии молекул адгезии мигрирующие клетки связываются с базальной мембраной эндотелия, выделяют ферменты, лизирующие коллаген и другие компоненты мембраны, что обеспечивает проникновение лейкоцитов в ткань. Существенные изменения прокоагулянтной и фибринолитической активности лейкоцитов возникают при заболеваниях, сопровождающихся изменением иммунного статуса организма [11]. Стимуляция под действием гормонов щитовидной железы лимфоцитов приводит к выбросу активаторов плазминогена, содержащихся в составе лизосомальных ферментов клеток, и активации клеточного фибринолиза, связанного с эндотелием, лейкоцитами и тромбоцитами [2, 10]. Этот процесс поддерживает специфическую активность как местного, так и системного фибринолиза.

Заключение

Таким образом, результаты исследования больных ДТЗ на фоне тиреотоксикоза свидетельствуют о важной роли нарушений механизма иммунологической регуляции в патогенезе повреждения сосудистого эндотелия, которое проявляется увеличением уровня t-PA и циркулирующих эндотелиоцитов и уменьшением содержания PAI-1, а неадекватная активация фибринолиза является результатом изменения гемостатических свойств эндотелия у больных ДТЗ на фоне тиреотоксикоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Благосклонная Я. В., Бабенко А. Ю., Кетлинский С. А. и др. // Мед. иммунол. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 345—350.
2. Братчик А. М. Клинические проблемы фибринолиза. — Киев, 1993.
3. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний / Под ред. Н. Н. Петрищева, Л. П. Папаян. — 1999. — С. 12—46.
4. Глазнова Т. В., Бубнова Н. Н., Мазуров В. И. // Мед. иммунол. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 257—270.
5. Глазнова Т. В., Бубнова Л. Н., Кузмищев А. С. и др. // Там же. — № 4. — С. 385—392.
6. Иммунодефицитные состояния / Под ред. В. С. Смирновой, И. С. Фрейдлина. — СПб, 2000. — С. 17—89.
7. Петрищев Н. Н., Беркович О. А., Власов Т. Д. и др. // Клин. лаб. диагн. — 2001. — № 1. — С. 50—52.
8. Ройт А., Брестовф Дж., Мейл Д. Иммунология: Пер. с англ. — М., 2000. — С. 83—95.
9. Руководство по клинической эндокринологии / Под ред. Н. Т. Старковой. — СПб, 1996. — С. 124—144.
10. Сухих Г. Г., Ванько Л. В., Кулаков В. И. // Иммуитет и генитальный герпес. — Н. Новгород; М., 1997. — С. 102—105.
11. Шиффман Фред Дж. // Патофизиология крови: Пер. с англ. — СПб., 2000. — С. 191—213.
12. Ярилин А. А. // Иммунология. — 1999. — № 1. — С. 14—17.
13. Duff G. W. // Rheumatology. — 1994. — Vol. 23. — Suppl. 100. — P. 9—19.
14. Sfrikakis P. P., Tesar S., Baraf H. et al. // Clin. Immunol. — 1993. — Vol. 68. — P. 88—93.
15. Waksman B. H., Reynolds W. E. // Biol. and Med. — 1984. — Vol. 175. — P. 282—294.

Поступила 07.07.02