

58. Насонов Е.А., Самсонов М.Ю., Беленков Ю.Н., Фукс Д. Иммунопатология застойной сердечной недостаточности: роль цитокинов. Кардиология 1999; 39; 3: 66-73.
59. Маянский А.Н. Туберкулез (микробиологический и иммунопатогенетические аспекты). Иммунология 2001; 2: 53-63.
60. Манак Н.А. Понятие о дифференцированном и индивидуализированном лечении больных стенокардией. Здоровоохранение Беларуси 1995; 6: 35-6.

Н.В.ПИВЕНЬ<sup>1</sup>,  
В.В.НОВИКОВ<sup>2</sup>,  
Л.Н.ЛУХВЕРЧИК<sup>3</sup>,  
Е.И.КУЗЬМЕНКОВА<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт  
биоорганической химии НАН Б,  
<sup>3</sup>Международный экологический  
университет им.А.Д.Сахарова,  
<sup>4</sup>Республиканский  
консультативный  
эндокринологический центр  
МЗ РБ, Минск, Беларусь,  
<sup>2</sup>Нижегородский  
государственный  
университет  
им.Н.И.Лобачевского, Россия

УДК 612.017.1 – 573.6.086.83:57.083.3

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ FAS-РЕЦЕПТОРА (CD95) У ЛИЦ С ПАТОЛОГИЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С целью изучения патогенетической роли нарушений механизмов апоптоза при различных формах патологии щитовидной железы (ЩЖ) изучена концентрация растворимой формы Fas-рецептора (FasR, CD95) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) на основе моноклональных антител (МАТ) у лиц со скрытым и клинически выраженным гипотиреозом, а также у больных раком ЩЖ. Обнаружено повышение концентрации FasR при различных формах гипотиреоза и снижение у больных с онкопатологией ЩЖ. Сделан вывод о взаимосвязи характера патологического процесса и концентрации FasR в крови, которая может служить количественным маркером нарушений механизмов апоптоза при патологии ЩЖ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, Fas-рецептор - CD95, щитовидная железа, гипотиреоз

*Иммунопатология, аллергология, инфектология 2001, 3: 15-20.*

## EZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF FAS-RECEPTOR (CD95) IN THE PATIENTS WITH THYROID PATHOLOGY

N.V. PIVEN<sup>1</sup>, V.V. NOVIKOV<sup>2</sup>, L.N. LUCHVERCHIK<sup>3</sup>, E.I. KUZMENKOVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the Belarus National Academy of Sciences,

<sup>3</sup>International Sakharov Environmental University,

<sup>4</sup>Republican endocrinological center, Minsk, Belarus,

<sup>2</sup>University of Nizhnii Novgorod, Russia

We have studied concentration of Fas-receptor (FasR) soluble forms in blood serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on the basis of monoclonal antibodies (MAb) in the patients with thyroid pathology (latent and manifest hypothyroidism,

thyroid cancer). Concentration FasR have increased in the patients, suffering from hypothyroidism. The FasR level have decreased in the patients with thyroid cancer. Connection have detected between different forms of thyroid pathology and concentration FasR.

**KEY WORDS:** *apoptosis, Fas-receptor - CD95, thyroid gland, hypothyroidism Immunopathol., allergol., infectol. 2001, 3: 15-20.*

В последние годы одной из актуальных проблем экспериментальной и клинической медицины является изучение патогенетической роли нарушений молекулярных механизмов апоптоза в развитии целого ряда заболеваний. Показано существование взаимосвязи между нарушениями регуляции процесса апоптоза и развитием онкологических, аутоиммунных и других заболеваний [1], сопровождаемое снижением эффективности иммунологического надзора. Исследования целого ряда авторов выявили новые механизмы подавления иммунологического надзора, связанные с апоптозом и Fas-антигеном-рецептором (FasR, APO-1, CD 95) [2].

FasR относится к рецепторным белкам семейства факторов некроза опухолей - ФНО. Он экспрессируется на поверхности многих типов клеток: тимоцитов, фибробластов, гепатоцитов, кератиноцитов, активированных Т- и В-лимфоцитов [3,4]. FasR у человека состоит из 335 аминокислотных остатков и относится к мембранным белкам I типа. В его структуре выделяют внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический домены [5]. Примерно 80 аминокислотных остатков образуют домен клеточной смерти, который, участвуя в белок-белковом взаимодействии с цитоплазматическими белками, генерирует сигнал разрушения клетки [6]. Основная функция системы Fas-рецептор-Fas-лиганд (FasL) - индукция апоптоза в клетках [7]. При связывании лиганда с рецептором происходит олигомеризация цитоплазматических белков, в результате чего активируется апоптозоспецифическая протеаза (каспаза-8) и развиваются характерные для апоптоза процессы [8]. Таким образом, взаимодействие FasR с FasL (или моноклональными антителами к FasR) приводит к запуску апоптоза в клетке [9].

Менее изучена значимость растворимых сывороточных форм FasR, которые образуются либо за счет протеолитического расщепления мембранных форм (shedding - шеддинг), либо за счет альтернативного сплайсинга мРНК, приводящего к образованию транскрипта, соответствующего растворимой форме. Чаще всего это укороченный транскрипт, не содержащий участка, соответствующего трансмем-

бранному региону [10]. Механизмы регулирующего действия растворимых форм FasR в организме могут быть различными и еще до конца не изучены. Первоначально считалось, что растворимые формы блокируют связывание мембранной формы FasR с Fas-лигандом за счет взаимодействия с FasL в кровотоке. Однако в настоящее время существуют сведения об участии растворимых форм FasR в защите FasL от деградации, передаче проапоптотического сигнала и запуске апоптоза. Сам факт сброса FasR с мембраны при протеолитическом шеддинге может приводить к модуляции иммунных реакций и возникновению различных эффектов, участвующих в патогенетических механизмах, с одной стороны, и вносящих свой вклад в нарушение гомеостаза - с другой [11].

**Целью** настоящей работы было изучить концентрацию растворимой формы Fas-рецептора методом иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител (МАТ) и оценить ее клинико-диагностическую и патогенетическую роль при различных формах патологии ЩЖ (субклинический гипотиреоз, аутоиммунный тиреоидит, рак).

**Материалы и методы.** Было обследовано 72 человека в возрасте от 18 до 40 лет: 32 человека - со скрытым доклиническим гипотиреозом, 20 - лица с клинически выраженным гипотиреозом (аутоиммунный тиреоидит), 9 - больные, прооперированные по поводу рака ЩЖ, контрольную группу составили здоровые лица (11 человек) того же возраста. У всех обследованных лиц методом радиоиммуноанализа предварительно был изучен тиреоидный статус путем оценки концентрации тиреоидных гормонов - тиротропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (Т3), тироксина (Т4) и белков - тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ), тироглобулина (ТГ).

Концентрацию FasR (CD95) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа на основе МАТ у этих же лиц по следующей схеме. Вначале стрипы сорбировали первыми МАТ к FasR, внося по 100 мкл в каждую лунку

с последующей инкубацией в течение 18-20 часов при  $t$  20-26°C во влажной камере. После четырехкратной промывки фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением твин-20,  $pH$   $7,0 \pm 0,5$  (ФСР-Т) во все лунки вносили по 100 мкл 2% раствора пептона и вновь инкубировали во влажной камере при 20-26°C в течение одного часа. После проведения четырехкратного промывания вносили в лунки контрольные и анализируемые образцы сывороток крови (100 мкл); для контроля конъюгата в 3 лунки вносили по 100 мкл раствора ФСР-Т. Проводили инкубацию в течение 18-20 часов при 20-26°C, закрыв стрипы крышкой. Затем пробы промывали 6 раз и вносили по 100 мкл приготовленного непосредственно перед применением вторых МАТ против FasR, меченных пероксидазой хрена. Инкубировали во влажной камере в течение 1 часа с последующим промыванием (6 раз). Затем вносили по 100 мкл субстрата (перекись водорода) и ортофенилен диамина, растворенного в цитратном буфере ( $pH$   $5 \pm 0,5$ ), и выдерживали пробы в течение 8-10 мин при 20-26°C. После этого добавляли по 50 мкл 15%-ного раствора  $H_2SO_4$  и немедленно проводили учет результатов анализа. Результаты оценивали на основании калибровочной кривой (Рис.1), отражающей зависимость оптической плотности от концентрации контрольного образца сыворотки с определенным содержанием FasR (принимая оптическую плотность разведения 1:2 за 1000 условных единиц).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ "BIOSTAT" и "EXEL".

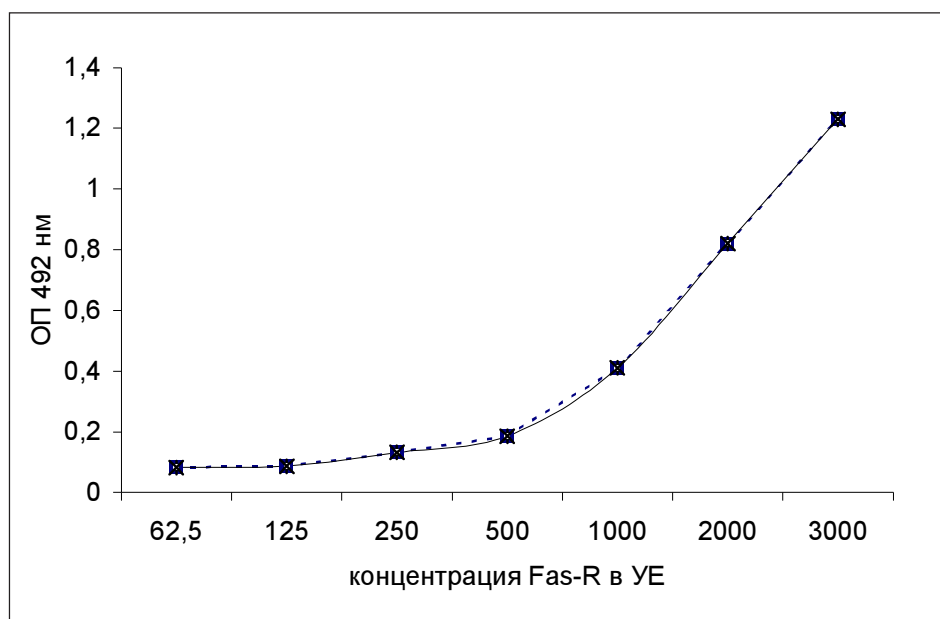
### Результаты и обсуждение

Проведенное нами комплексное клиничко-лабораторное обследование позволило разделить всех обследованных лиц на 4 группы в соответствии с общепринятой классификацией [12,13]: здоровые лица, лица с доклиническим гипотиреозом, больные с клинически выраженной гипофункцией ЩЖ на фоне аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и больные с различными формами рака ЩЖ (Табл.1).

Субклинический гипотиреоз характеризовался повышением уровня ТТГ на фоне нормального содержания Т4, Т3 и ТСГ, а клинически выраженный гипотиреоз - повышением уровня ТТГ и ТСГ, снижением уровня Т3 и Т4. Больные раком ЩЖ на момент обследования получали заместительную терапию тироксином (Т4) для коррекции послеоперационного гипотиреоза.

Результаты иммуноферментного анализа концентрации Fas-рецептора в сыворотке крови представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, в группе обследуемых с субклиническим гипотиреозом отмечалось повышение уровня Fas-R в 2,9 раза, а у лиц с клинически выраженным гипотиреозом – в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Уровень FasR у лиц с онкопатологией ЩЖ был снижен в 3 раза по сравнению с контрольной группой.



**РИС.1**  
Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации Fas-R в калибровочных пробах

Таблица 1

## Тироидный статус обследованных лиц (M±m)

Обследуемые группы	Т3 общ. нмоль/л	Т4 общ. нмоль/л	ТТГ мМЕ/л	ТСГ мг/л	ТГ нг/мл
Здоровые лица (n=11)	2,12±0,09	109,2±6,8	1,31±0,19	23,1±1,5	24,6±2,4
Субклинический гипотиреоз (n=32)	2,1±0,16	129,97±9,5*	3,14±0,39*	24,2±1,35	6,54±0,7*
АИТ с клинически выраженным гипотиреозом (n=20)	1,78±0,15*	80,65±6,9*	20,15±2,3*	68,1±2,14	9,1±0,9*
Рак ЩЖ, (n=9)	2,48±0,61	134,19±13,8	3,66±0,97*	39,7±9,29	38,2±8,4

\* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2

## Концентрация FasR в сыворотке крови лиц с различными формами патологии ЩЖ (M±m)

Обследуемые группы	Количество CD95 в У.Е
Здоровые лица, (n=11)	356,9±47,69
Субклинический гипотиреоз (n=32)	1035,69±202,6*
АИТ с клинически выраженным гипотиреозом (n=20)	763,6±46,18*
Рак ЩЖ (n=9)	106±4,79*

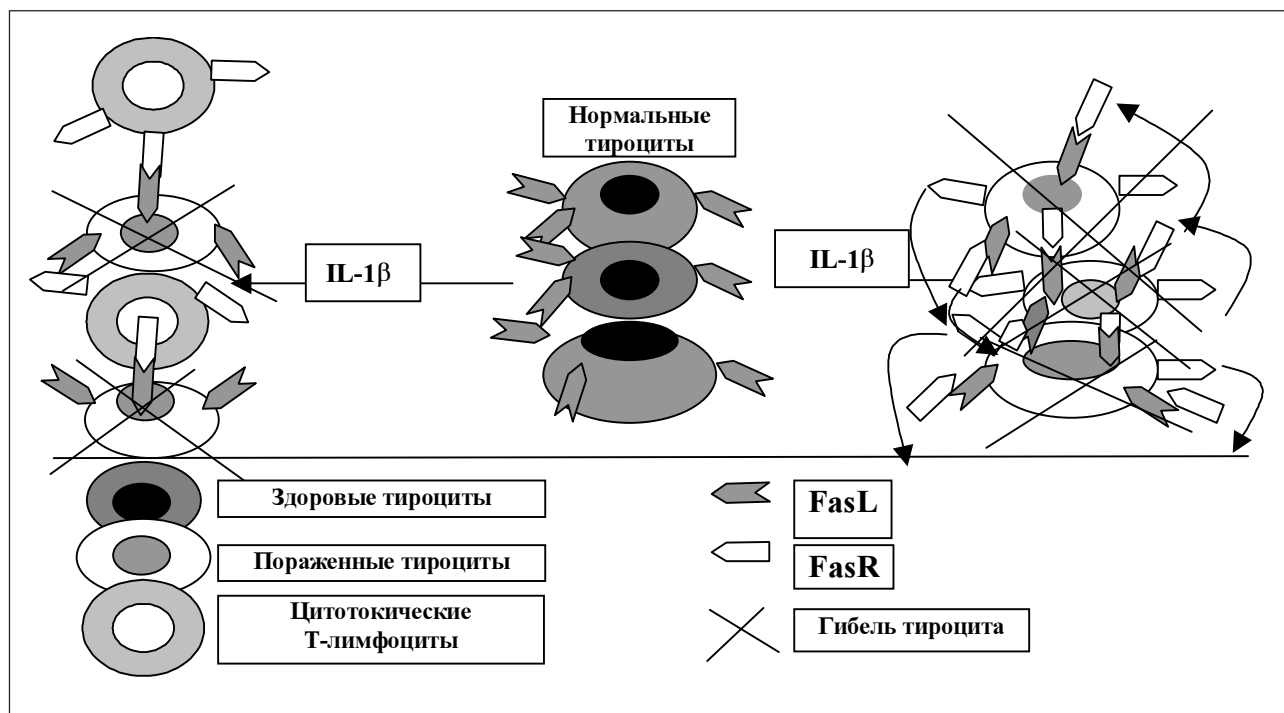
Известно, что у нормально функционирующих тироцитов экспрессия FasR на их мембране незначительна на фоне активной экспрессии FasL [14]. Вероятно, такой механизм защищает ЩЖ от воздействия клеток собственной иммунной системы [15]. Однако при развитии аутоиммунных процессов, сопровождающихся воспалением, макрофаги и моноциты периферической крови начинают синтезировать ИЛ-1 $\beta$ , который стимулирует массивную экспрессию FasR на мембране тироцитов. В результате одновременной активной экспрессии FasR и FasL в тироцитах запускается программа апоптоза [16,17]. Кроме того, повышенная экспрессия FasR на тироцитах делает их доступными для цитотоксических CD8<sup>+</sup>- Т-лимфоцитов [18], которые в результате их активации экспрессируют FasL. Можно предположить, что эти процессы усугубляют повреждение тироцитов и способствуют развитию аутоиммунной патологии. Описанный механизм схематично изображен на рис.2.

Обнаруженное нами снижение Fas-R у онкологических больных, вероятно, можно связать с подавлением экспрессии и блокадой Fas-R стимуляторами опухолевого роста, которые защищают опухолевые клетки от развития в них процессов апоптоза [19-21]. Кроме того, опухолевые клетки сами секретируют растворимые супрессорные факторы, уг-

нетающие развитие апоптоза через механизм FasR-FasL. Все это приводит к блокаде механизмов апоптоза, следствием которой является бесконтрольная пролиферация опухолевых клеток и проявление несостоятельности противоопухолевого иммунитета.

Выявленные нами нарушения регуляторных механизмов апоптоза сопровождаются различными изменениями концентрации FasR в крови. Концентрация FasR повышается при гипотиреозе, причем степень этого повышения зависит от стадии гипотиреоза: если при субклиническом гипотиреозе экспрессия FasR достаточно высока, то при клинически выраженном его концентрация снижается, однако, остается существенно выше, чем у здоровых лиц. В то же время у больных раком ЩЖ уровень FasR в крови значительно снижен по сравнению с контролем. Все это позволяет говорить о взаимосвязи характера патологических нарушений с функционированием системы FasR-FasL.

Таким образом, можно заключить, что подавление иммунологического надзора и нарушение регуляции механизмов апоптоза может являться одним из патогенетических механизмов развития заболеваний ЩЖ, а концентрация FasR (CD95) в крови – количественным маркером этих нарушений и прогностическим критерием развития той или иной формы патологии.



**РИС.2.** Схема развития апоптоза в тироцитах при аутоиммунной патологии

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abastado J.-P. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol* 1996; 147:443-56.
2. Adrens M.J., Wylle A.H. Apoptosis. Mechanism and role in pathology. *Intern. Rev. Exp.Pathol.* 1991; 32: 223-54.
3. Adachi M., Suematsu S., Kondo T. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Med.* 1995; 11:294-99.
4. Peng S.L., Robert M.E., Hayday A.C., Craft J. A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice. *J Exp. Med.* 1996; 84: 1149-54.
5. Аббасова С.Г., Липкин В.М., Трапезников Н.Н., Кушлинский Н.Е. Система Fas-FasL в норме и при патологии *Вопросы биол.мед. и фарм. химии* 1999; 3:3-16.
6. French L.E., Tschopp J. Thyroiditis and hepatitis: Fas on the road to disease. *Nat Med.* 1997; 4:387-88.
7. French L.E., Hahne M., Viard I. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *Cell Biol* 1996; 133:335-43.
8. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. Санкт-Петербург: Наука; 1996.
9. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Lazareva N.I., Lukashina M.I., Shishkin Yu.V. et al Fas (APO-1/CD95) Antigen: New Activation Marker for Evaluation of the Immune Status *Rus. J of Immunology* 1997; 2: 116-19.
10. Bufler P., Stiegler G., Schuchmann M., Hess S., Kruger C. et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *J Immunol.* 1995; 25:604-610.
11. Weetman A.P., McGregor A.M. Antigen presentation in the pathogenesis of autoimmune endocrine disease. *J Autoimmun.* 1995; 3:305-12.
12. Krumskemper H.L. Rational diagnosis of thyroid disease. Vienna 1977;143-52.
13. Falk S.A. *Thyroid Disorders.* New York 1997; 17-20.
14. De Maria R., Testi R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunology Today* 1998; 19:121-25.
15. De Flora A., Franco L., Guida L., Bruzzone S., Zocchi E. Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca(2+)-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem Biophys* 1998;28:45-62.

16. Dayan C.M., Danirls G.H. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996; 335:99-107.
17. Champion B.R., Cooke A., Rayner D.C. Thyroid autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1992; 6:770-78.
18. Giordano C., Stassi G., De Maria R. . Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science.* 1997; 275:960-3.
19. Benoist C., Mathis D. Cell death mediators in autoimmune diabetes—no shortage of suspects. *Cell.* 1997; 89:1-3.
20. Wright S.C., Zhong J., Larrick J.W. Inhibition of apoptosis a mechanism of tumor promotion. *FASEB J.* 1994;8:654-60.
21. Барышников А.Ю., Шелепов В.П., Кузнецов С.В., Шишкин Ю.В., Седяхина Н.П., Донская О.Н. Экспрессия и проявление функциональной активности Fas/APO-1/CD95-антигена, опосредующего апоптоз, при гемобластозах у человека. *Гематол. и трансфузиол.* 1996; 5:42-44.

И.В. КУМАЛАНИНА,  
Ю.И. ШИЛОВ,  
М.Ф. БОЛОТОВА

Пермская государственная  
медицинская академия МЗ РФ,  
Пермь, Россия  
Институт экологии и  
генетики микроорганизмов  
УрО РАН, Пермь, Россия

УДК 612.017.1:616.34

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ОТДЕЛЬНЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЦЕЛИАКИИ В ФАЗЕ НЕПОЛНОЙ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ РЕМИССИИ

Изучены изменения отдельных звеньев иммунной системы у 11 детей, больных целиакией в фазе неполной клинико-лабораторной ремиссии, находившихся в течение 6-12 месяцев до обследования на аглиадиновой диете. В условиях строгого соблюдения аглиадиновой диеты уровень антиглиадиновых антител класса IgA снижается до нормальных значений, а антител класса IgG остается повышенным у 80 % больных. Выявлено развитие лимфоцитоза с увеличением абсолютного числа CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD22<sup>+</sup>-лимфоцитов и нулевых клеток (CD3<sup>+</sup>22<sup>-</sup>), абсолютного и относительного количества CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов. Отмечено снижение числа моноцитов и нейтрофилов крови, сопровождающееся увеличением относительных показателей фагоцитоза (фагоцитарного числа, процента фагоцитоза и фагоцитарного индекса). Эти изменения указывают на сохраняющуюся активацию иммунной системы после диетотерапии у больных целиакией.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** целиакия, иммунная система, антиглиадиновые антитела.  
*Иммунопатология, аллергология, инфектология* 2001, 3: 20-26.

## ANALYSIS OF CHANGES OF THE DIFFERENT LINKS OF IMMUNE SYSTEM IN COELIAC DISEASE IN THE PHASE OF INCOMPLETE CLINICAL AND LABORATORY REMISSION

I.V. KUMALANINA, J.I. SHILOV, M.F. BOLOTOVA  
*Perm State Medical Academy of Ministry of Public Health, Perm, Russia;*  
*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Urals Department*  
*of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*