

Выраженность окислительного стресса и энзиматическая активность нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза

М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.А. Савченко, И.И. Гвоздев

*ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»,
обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия
КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия*

В основе гипертиреоза аутоиммунного генеза при болезни Грейвса лежит образование иммуноглобулинов класса G, которые связываются с рецептором тиреотропного гормона (рТТГ) и являются единственным иммунологическим маркером рецидивирования заболевания [1]. Окислительный стресс при болезни Грейвса может привести к повреждению периферических тканей, способствуя как клиническому проявлению тиреотоксикоза, так и цитопатогенному воздействию на тиреоциты с последующей потерей аутоотолерантности к собственным антигенам щитовидной железы [2, 3]. Имеются противоречивые сообщения о том, что анти-тиреоидные препараты снижают выраженность окислительного стресса за счет восстановления эутиреоза и повышения антиоксидантного потенциала плазмы [4]. Однако до сих пор остается неизученной радикал-продуцирующая способность нейтрофилов при консервативной терапии болезни Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза. Функционирование NADPH-оксидазного комплекса и интенсивность метаболических процессов в нейтрофилах периферической крови могут определять их функциональные возможности при развитии и последующем поддержании аутоиммунной реакции при болезни Грейвса [5]. Сигнальные взаимодействия между тиреоидными гормонами и уровнем продукции активных форм кислорода (АФК), а также сложные взаимосвязи реакций внутриклеточного метаболизма клеток иммунной системы и их роль в развитии рецидива гипертиреоза при болезни Грейвса определяют необходимость поиска новых маркеров для разработки этиотропных терапевтических подходов к лечению заболевания.

Цель. Изучить выраженность окислительного стресса и энзиматическую активность нейтрофилов крови у пациентов с болезнью Грейвса в зависимости от компенсации гипертиреоза.

Материал и методы. В проспективное исследование включены 126 женщин с лаборатор-

но подтвержденной болезнью Грейвса, средний возраст $40,7 \pm 13,21$ года. Все пациентки наблюдались в Клинике эндокринологического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (г. Красноярск) с дебюта заболевания. Клинико-гормональное обследование пациентов проводилось при манифестации заболевания, до начала тиреостатической терапии, а также через шесть недель консервативной терапии тиамазолом для оценки компенсации гипертиреоза. Через три месяца от начала назначения тиамазола при приеме поддерживающей дозы тиреостатика всем пациентам выполнялось контрольное клинико-иммунологическое обследование. Группы пациентов с компенсированным (медикаментозный эутиреоз) и некомпенсированным гипертиреозом (рецидив) были сформированы согласно критериям диагностики и протоколу консервативного лечения болезни Грейвса национальных клинических рекомендаций [6]. Методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микропластиках на автоматическом анализаторе Architecti1000sr (AbbottDiagnostics, США) определяли уровень ТТГ и свободного тироксина (свТ4) в сыворотке крови, указанный референсный диапазон соответственно 0,4–4,0 мЕд/л и 9,01–19,05 пмоль/л. Содержание свободного трийодтиронина (свТ3) в сыворотке крови измеряли методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ДС-ИФА-ТИРОИД-Т3свободный» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия), референсный интервал 2,14–6,42 пмоль/л. Уровень антител к рТТГ оценивали методом ИФА при помощи стандартного набора Medizym T.R.A. (MedipanDiagnostics, Германия), рекомендованная точка разделения (cut-off) — 1,5 мЕд/л («серая» зона 1–1,5 мЕд/л). Выраженность окислительного стресса в нейтрофилах крови оценивали методом спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛИМ-3607» (ООО

«МедБиоТех», Красноярск) [7]. Реактивность нейтрофилов периферической крови была охарактеризована следующими показателями: время выхода на максимум (T_{\max} — скорость развития хемилюминесцентной реакции), максимальное значение интенсивности (I_{\max} — максимальный уровень синтеза АФК) и площадь под кривой хемилюминесценции (S — суммарный синтез АФК за 90 минут измерения). В качестве индикаторов хемилюминесцентной реакции использовали люцигенин (реакция светоизлучения только при взаимодействии с супероксид-радикалом) и люминол (реакция светоизлучения при взаимодействии со всеми АФК). С помощью биoluminesцентного анализа в нейтрофилах периферической крови определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ соответственно) и глутатион-редуктазы (ГР). Активность исследуемых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах ($1\text{Е} = 1\text{ мкмоль/мин на } 10^4\text{ клеток}$). Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FMN оксидредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathii* (полученном в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск). Активность ферментов измеряли на анализаторе «БЛМ-3607». Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Результаты. При верификации болезни Грейвса манифестный гипертиреоз диагностировали у 108 (85,71 %) пациентов, субклинический — у 18 (14,28 %), у первых содержание ТТГ составило 0,01 (0,002–0,05) мЕд/л, свТ3 — 6,79 (5,91–8,94) пмоль/л, свТ4 — 21,52 (19,21–32,37) пмоль/л, у последних — соответственно 0,04 мЕд/л (0,003–0,01), 4,12 (2,31–5,43) пмоль/л и 15,01 (10,81–17,33) пмоль/л. Медиана уровня антител к рТТГ у обследованных пациентов с болезнью Грейвса статистически значимо не различалась в зависимости от степени тяжести гипертиреоза на момент манифестации заболевания и составила 15,29 мЕд/л (9,21–24,52). Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофилов крови у обследуемых пациентов на момент верификации болезни Грейвса не различалась в зависимости

от последующей компенсации гипертиреоза и характеризовалась сокращением времени реагирования на стимул (T_{\max}) люцигенин-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции и увеличением интенсивности образования вторичных АФК в ходе люминол-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной реакции, а также внутриклеточным повышением активности Г6ФДГ, ингибированием анаэробного гликолиза и стимуляцией субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот.

При динамическом наблюдении через 6 недель после инициации тиреостатической терапии у всех пациентов диагностировался медикаментозный эутиреоз: концентрация ТТГ = 0,67 (0,42–2,83) мЕд/л, свТ3 = 4,79 (2,15–5,61) пмоль/л, свТ4 = 12,63 (10,23–17,37) пмоль/л. При контрольном обследовании через три месяца от момента начала тиреостатической терапии, при приеме поддерживающей дозы тиреостатика у 93 (73,81 %) пациентов с болезнью Грейвса определялся стойкий медикаментозный эутиреоз, у 33 (26,19 %) человек был диагностирован рецидив тиреотоксикоза. При исследовании активности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что независимо от компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса повышается S хемилюминесцентной кривой. Причем при некомпенсированном гипертиреозе показатель суммарного синтеза АФК значительно возрастает как относительно контрольного диапазона, так и относительно значений, установленных у пациентов с компенсированным гипертиреозом. Похожая кинетика хемилюминесцентного ответа наблюдалась и при зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции, в ходе которой зафиксировано повышение в 4,35 раза S у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом, в сравнении с показателем суммарного синтеза АФК пациентов болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза. Независимо от степени компенсации гипертиреоза у пациентов с болезнью Грейвса снижено T_{\max} люцигенин-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции. При исследовании параметров спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у пациентов с компенсированным гипертиреозом повышаются показатели T_{\max} и S . При некомпенсированном гипертиреозе сокращается T_{\max} при увеличении в 7,21 раза показателя суммарного синтеза АФК относительно значений, установленных в группе пациентов с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза. При антигенной стимуляции нейтрофилов у пациен-

тов обеих групп обнаружено повышение показателей I_{\max} и S хемилюминесценции. При некомпенсированном гипертиреозе зафиксировано более чем десятикратное увеличение суммарного синтеза АФК относительно контрольных значений, но не выявлены статически значимые различия с показателями пациентов с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза. Снижение $S_{\text{инд}}/S_{\text{спонт}}$ у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом в сравнении с показателями пациентов с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза, при индукции «респираторного взрыва» с помощью опсонизированного зимозана, характеризует отсутствие метаболических резервов для функциональной активации нейтрофилов.

Независимо от компенсации гипертиреоза в нейтрофилах пациентов с болезнью Грейвса повышена активность исследуемых NAD-зависимых оксидоредуктаз (NAD-ГДГ и МДГ), вспомогательных дегидрогеназных реакций (NADP-ГДГ и NADP-ИЦДГ) и NADH-зависимых реакций (NADH-ЛДГ и NADH-МДГ), а также Г6ФДГ и шунтирующей реакции NADP-МДГ. Причем у пациентов с рецидивом заболевания активность Г6ФДГ и NADP-МДГ возростала не только относительно контроля, но и по сравнению с лицами с медикаментозным эутиреозом. Активность аэробной реакции ЛДГ у больных с рецидивом гипертиреоза статистически значимо возростала относительно значений активности фермента, установленных в группе пациентов с медикаментозным эутиреозом, но не отличалась от контрольных показателей. Высокий уровень активности NADH-ГДГ у пациентов с рецидивом гипертиреоза выявлен относительно как контрольного диапазона, так и показателей, установленных в группе лиц с болезнью Грейвса в состоянии медикаментозного эутиреоза. Снижение активности ЛДГ отмечалось у пациентов с медикаментозным эутиреозом. При этом активность Г3ФДГ и ГР не изменялась ни в одной из групп пациентов с болезнью Грейвса. С помощью корреляционного анализа обнаружено, что у пациентов с болезнью Грейвса концентрация свТ4 положительно взаимосвязана с S спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции: при компенсированном гипертиреозе — $r = 0,62$; $p = 0,009$ и $r = 0,58$; $p = 0,014$, при некомпенсированном гипертиреозе — $r = 0,73$; $p < 0,001$ и $r = 0,72$; $p < 0,001$ соответственно. Только у пациентов с некомпенсированным гипертиреозом обнаружена взаимосвязь между концентрацией свТ4 и I_{\max} спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,69$; $p = 0,001$). У пациентов обеих групп выявляются

положительные корреляции содержания свТ3 с активностью Г6ФДГ и NADP-МДГ в нейтрофилах: при компенсированном гипертиреозе — соответственно $r = 0,63$; $p = 0,010$ и $r = 0,47$; $p = 0,037$; при некомпенсированном гипертиреозе — соответственно $r = 0,75$; $p < 0,001$ и $r = 0,45$; $p = 0,022$. Только при некомпенсированном гипертиреозе установлена связь между концентрацией свТ4 и внутриклеточной активностью МДГ ($r = 0,52$; $p = 0,021$). При компенсированном гипертиреозе активность Г6ФДГ положительно коррелирует с I_{\max} спонтанной и S зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,54$; $p = 0,015$ и $r = 0,49$; $p = 0,020$ соответственно). При некомпенсированном гипертиреозе активность Г6ФДГ и NADP-ГДГ также положительно взаимосвязана с S спонтанной люцигенин-зависимой ХЛ нейтрофилов ($r = 0,74$; $p < 0,001$ в обоих случаях) и I_{\max} спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,69$; $p = 0,003$ и $r = 0,65$; $p = 0,005$ соответственно). У лиц контрольной группы взаимосвязей между показателями тиреоидного статуса и показателями хемилюминесцентной и метаболической активности нейтрофилов, а также между показателями синтеза АФК и активностью ферментов в нейтрофилах не обнаружено.

Заключение. Установлены особенности свободнорадикальных механизмов и уровень окислительного стресса нейтрофилов у пациентов с болезнью Грейвса при консервативной терапии тиамазолом в зависимости от компенсации гипертиреоза. Выявлено, что при некомпенсированном гипертиреозе активированы ферментативные реакции, характеризующие интенсивность анаэробных и аэробных процессов. Нарушение кислородного метаболизма нейтрофилов крови у пациентов в состоянии медикаментозного эутиреоза преимущественно затрагивают первичное звено генерации АФК — продукцию супероксидных радикалов, что сопряжено с компенсацией гипертиреоза и иммуносупрессивным эффектом тиамазола. У пациентов с рецидивом гипертиреоза, несмотря на снижение уровня антител к рТТГ при консервативной терапии тиамазолом, отмечаются более выраженные изменения в генерации прооксидантов не только на начальном этапе окислительных реакций, но и на уровне продукции вторичных АФК, свидетельствующие об активации иммунологических механизмов системного клеточного реагирования. Цитопатогенное действие нейтрофилов в генерации АФК при болезни Грейвса может рассматриваться как мишень таргетной терапии заболевания.

Литература

1. Chung J.H. Antithyroid drug treatment in Graves' disease. *Endocrinol. Metab. (Seoul)*, 2021; 36 (3): 491–499. doi:10.3803/EnM.2021.1070
2. Morshed S.A., Davies T.F. Understanding Thyroid Cell Stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2020; 105 (3). doi: 10.1210/clinem/dgz193
3. Догadin С.А., Дудина М.А., Савченко А.А., Маньковский В.А., Гвоздев И.И. Активность респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов крови в дебюте болезни Грейвса. *Проблемы эндокринологии*, 2017; 63 (1): 4–8. [Dogadin S.A., Dudina M.A., Savchenko A.A., Man'kovskii V.A., Gvozdev I.I. Respiratory burst activity in neutrophilic granulocytes in the onset of Graves' disease. *Problems of Endocrinology*, 2017; 63 (1): 4–8. (In Russ.)]. doi: 10.14341/probl20176314-8
4. Lanzolla G., Marcocci C., Marinò M. Oxidative stress in Graves disease and Graves orbitopathy. *Eur. Thyroid J.*, 2020; 9 (1): 40–50. doi: 10.1159/000509615
5. Gargouri B., Mseddi M., Mnif F., Abid M., Attia H., Lassoued S. Oxidative stress enhances the immune response to oxidatively modified catalase enzyme in patients with Graves' disease. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020; 34 (2): e23051. doi: 10.1002/jcla.23051
6. Российская Ассоциация Эндокринологов [доступ от 16.05.2021]. Доступ по ссылке https://raeorg.ru/system/files/documents/pdf/kr_versiya_3.0_fin_otredaktirovan_16.05.2021g.pdf
7. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. *Инфекция и иммунитет*, 2017; 7 (4): 327–340. [Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017; 7 (4): 327–340. (In Russ.)]. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340

DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-4-414-415

Применение NGS в диагностике наследственных форм сахарного диабета

Д.Е. Иваношук^{1,2}, Е.В. Шахтшнейдер^{1,2}, С.В. Михайлова¹, А.К. Овсянникова²,
О.Д. Рымар², М.И. Воевода¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,
г. Новосибирск, Россия

² НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,
г. Новосибирск, Россия

Сахарный диабет (СД) – распространенное заболевание, характеризующееся гипергликемией и сопутствующими метаболическими нарушениями. В отличие от наиболее часто встречающихся первого и второго типов СД (СД1 и СД2) с полигенным характером наследования, до 5 % клинических фенотипов минимально подвержены модулирующему действию факторов окружающей среды и ассоциированы, как правило, с носительством специфического варианта одного гена [1]. Менделевские подтипы сахарного диабета включают диабет взрослого типа у молодых, или MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young), неонатальный диабет, а также системные синдромальные формы.

Наличие моногенной формы диабета можно заподозрить, если клинические проявления у пациента не соответствуют классической картине как СД1, так и СД2, а именно: молодой возраст начала, отсутствие зависимости от инсулина, отсутствие титров антител к островкам поджелудочной железы, отсутствие ожирения или других признаков резистентности к инсулину, а также семейный анамнез СД в нескольких поколениях [2, 3].

Верифицировать у пациента моногенную форму СД возможно только при проведении молекулярно-генетического анализа. На основе данных о механизмах формирования менделевских подтипов СД разработаны алгоритмы по выявлению таких пациентов, сформированы персонализированные подходы к назначению сахароснижающих препаратов [4]. Интегрирование в практическую медицину методов секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) позволяет быстро и точно выполнять диагностику, корректировать лечение, выявлять группы риска и проводить раннюю профилактику заболевания и его осложнений [5].

Цель. Выявление генетических вариантов, определяющих развитие заболевания, с использованием высокотехнологичного секвенирования нового поколения у 280 пациентов с диагнозом СД и клиническими признаками моногенного типа СД.

Материал и методы. Секвенирование нового поколения проведено у 280 пробандов с диагнозом СД и клиническими признаками MODY-диабета с последующей верификацией обнаруженных вариантов прямым автоматиче-