

УДК 612.441

*Е. А. Кожевников, И. Е. Красовская, Г. П. Дидже***АКТИВНОСТЬ И АВИДНОСТЬ ФЕРМЕНТА ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ТИРЕОИДИТАХ**

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра биохимии

Введение. Во второй половине XX в. стал известен тот факт, что при болезни Грейвса и тиреоидите Хашимото в сыворотке больных обнаруживаются антитела к тиреоид-специфическим антигенам. Первым обнаруженным антигеном, вовлеченным в аутоиммунный тиреоидит, был тиреоглобулин — белок, синтезируемый в тиреоцитах и являющийся предшественником тиреоидных гормонов. Затем было выяснено, что в крови больных присутствуют антитела к рецептору тиреотропного гормона, Na/I-симпортеру и микросомальному антигену [2]. На сегодняшний день известно, что последний представляет собой тиреопероксидазу (ТПО) [4]. Показано, что аутоантитела к ТПО являются эффективными маркерами аутоиммунных тиреоидитов, и выявление их в сыворотке крови может свидетельствовать о патологических процессах, протекающих в щитовидной железе. На данный момент определение аутоантител к ТПО в сыворотке пациентов является неотъемлемой частью диагностирования патологий щитовидной железы (ЩЖ).

Проблемы патогенеза ЩЖ являются актуальными на сегодняшний день, так как данные заболевания принадлежат к наиболее часто встречающимся поражениям эндокринной системы. Так по данным ВОЗ, в России за последние 10 лет значительно повысился уровень заболеваний ЩЖ, что может быть связано со стрессами, которыми современная жизнь становится все насыщенней. Кроме того, большое значение имеет ненормированность потребления йода, вследствие неоднородного распределения последнего в питьевой воде различных регионов земного шара. Развитие представлений об иммунной системе, о стрессорных состояниях организма, освоение методов выявления генетических предрасположенностей дали ключ к решению этих проблем.

Было разработано множество концепций, описывающих важность тех или иных факторов в развитии аутоиммунного тиреоидита, но на сегодняшний день точная последовательность событий, вовлекающая иммунную систему в патологический процесс, неизвестна.

Цель данного исследования заключалась в разработке метода тестирования функциональных нарушений тиреопероксидазы и оценке взаимосвязи между показателями, исследуемыми в ходе данного теста, и конкретной патологией щитовидной железы.

Материалы и методы исследования. В работе использовалась тиреоидная пероксидаза, выделенная из операционного материала, взятого у больных со следующими диагнозами: диффузный токсический зоб ($n = 10$), полинодозный зоб с фолликулярной аденомой ($n = 10$). В качестве контроля использовали фермент, полученный из постмортальной ЩЖ субъектов без выраженных тиреоидных патологий ($n = 10$).

Выделение тиреоидной пероксидазы человека производилось по методу, описанному ранее [5] с некоторыми вариациями. Для каждого препарата фермента была выяснена активность и авидность.

© Е. А. Кожевников, И. Е. Красовская, Г. П. Дидже, 2008

Активность оценивали в ходе ферментативной реакции с фенольным субстратом гваяколом [5]. Измерение концентрации белка производилось с помощью метода Лоури в модификации G. R. Shachterle и R. L. Pollack [6], а также спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Причем последний метод использовался для растворов антител и ТПО, содержащих незначительное количество примесей. Чистота данных препаратов оценивалась с помощью электрофореза в ПААГ [3].

Для оценки avidности, величины косвенно характеризующей конформационное состояние молекулы ТПО, использовали иммуно-ферментный анализ (ИФА) [1] на полистирольных планшетах (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Антителами, непосредственно связывающимися с ферментом, служили поликлональные антитела к ТПО, выделенные из крови человека. Такой комплекс антиген-антитело детектировали с помощью моноклональных антител мыши к λ - и κ -цепям иммуноглобулинов человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В качестве субстрата для пероксидазной реакции использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Neogen, США). Оптическая плотность оценивалась с помощью анализатора иммуноферментных реакций «Униплан» (Пикон, Россия). Максимальное поглощение принималось за 100 %, а оптическая плотность контроля за 0 %. Таким образом, avidность вычислялась как оптическая плотность и коррелировала с количеством поликлональных антител, связавшихся с различными эпитопами ТПО.

Результаты исследования и их обсуждение. Были получены аффинно-чистые препараты ТПО для каждого исследуемого пациента. Чистота данных препаратов составляла $95,1 \pm 2,6$ % (рис. 1). Вся совокупность образцов аффинно-очищенной ТПО ($n = 30$) была протестирована с помощью ИФА. Данные по оптическим плотностям в процентах, полученные в результате ИФА и количественно оценивающие avidность каждого образца ТПО, при помощи методов вариационной статистики были разделены на группы (при $p < 0,005$). Таким образом, все исследуемые пациенты были разбиты на следующие три группы: с нормальной ($43,50 \pm 4,38$ %), повышенной ($96,64 \pm 6,42$ %) и пониженной ($18,02 \pm 3,17$ %) avidностью ТПО. Нормальная avidность была обнаружена у всех образцов ТПО, выделенных из постмортальной ЩЖ субъектов без выраженных тиреоидных патологий ($n = 10$), по этой причине она и была названа «нормальной». Кроме того, в группу с нормальной avidностью попали пациенты с диффузным токсическим зобом ($n = 10$, группа № 1). В группу с повышенной avidностью ТПО попали пациенты с полинодозным зобом и фолликулярной аденомой ($n = 10$, группа № 2).

Для каждого пациента была измерена удельная активность ТПО, т. е. количество (в микромолях) субстрата, превращаемого за 1 мин на 1 мг белка. Для сопоставления и статистической обработки использовали данные, полученные для фракций аффинно-очищенной ТПО. В пределах каждой группы пациентов, выделенных на основании данных об avidности ТПО, была посчитана средняя удельная пероксидазная активность (рис. 2). Средняя удельная активность ТПО у индивидов без выраженных тиреоидных патологий (контроль) составила $0,376 \pm 0,025$ мкмоль/мин·мг. Достоверно (при $p < 0,005$) повышенная по отношению к контролю удельная активность обнаружена у пациентов группы № 1 с диффузным токсическим зобом ($0,977 \pm 0,086$ мкмоль/мин·мг), пониженная (при $p < 0,005$) — у пациентов группы № 2 с полинодозным зобом ($0,098 \pm 0,021$ мкмоль/мин·мг).

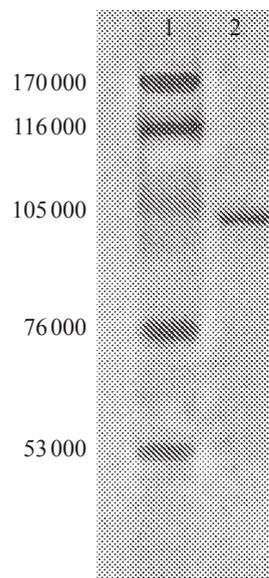


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ТПО после аффинной хроматографии
1 — маркеры молекулярной массы: 170 кДа ($\alpha 2$ -макроглобулин); 116 кДа (β -галактозидаза); 76 кДа (трансферрин); 53 кДа (глутамат дегидрогеназа); 2 — аффинно очищенная ТПО (контроль № 2).

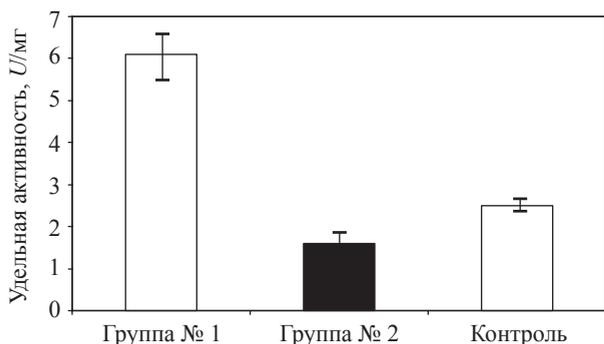


Рис. 2. Диаграмма распределения средней удельной активности ТПО по группам с различной avidностью

Группа № 1 — пациенты с диффузным токсическим зобом; группа № 2 — пациенты с полинодозным зобом; контроль — субъекты без выраженных тиреоидных патологий. Белые столбцы — нормальная avidность, черные — повышенная.

Обнаруженная корреляция между клинической картиной и исследуемыми нами биохимическими характеристиками одного из важнейших антигенов ЩЖ, а также непосредственного участника синтеза тиреоидных гормонов — тиреопероксидазы послужила основой для гипотезы, рассматривающей дифференциальную потерю активности ТПО, как причину возникновения аутоиммунитета. Таким образом, в ходе пероксидазного цикла фермента и при участии тиреоидной NADPH-оксидазы могут образовываться радикалы или гипогаллоидные кислоты [7], перенос которых на тиреоглобулин не происходит, что приводит к повреждению апикальной мембраны тироцита, нарушающему целостность фолликула и обеспечивающему доступность ТПО для иммунной системы.

Summary

Kozhevnikova E. A., Krasovskaya I. E., Dizhe G. P. Activity and avidity of thyroperoxidase enzyme in autoimmune thyroiditis

Biosynthesis of thyroid hormones is an oxidative process that generates reactive oxygen species and involves thyroperoxidase (TPO). At present a linkage between oxidative stress and triggering of autoimmune reactions has been reported, which emphasizes the importance of increased reactive oxygen species generation in condition of thyroid peroxidase hyperactivity. To verify this hypothesis, a relationship between TPO enzymatic activity and its avidity in patients with autoimmune thyroiditis was determined. The linkage between diagnosis and the enzyme parameters shows that this alterations in TPO function may lead to reduction of oxidation disbalance which in turn may change TPO accessibility for an immune system.

Key words: thyroperoxidase, autoimmune thyroiditis.

Литература

1. Кэтти Д., Райкундалия И. Иммуноферментный анализ // Антитела. Методы / Пер. с англ. Т. 2. М., 1991. С. 152–238.
2. DeGroot L. J., Quintans J. The causes of autoimmune thyroid disease // *Endocrine Rev.* 1989. Vol. 10. P. 537–562.
3. Laemmli U. K. New approach in electrophoresis // *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
4. Mariotti S., Anelli S., Ruf J., Bechi R., Czarnocka B., Lombardi A., Carayon P. and Pinchera A. Comparison of serum thyroid microsomal and thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases // *J. Clinic. Endocrinol. and Metabol.* 1987. Vol. 65. P. 987–993.

На основании полученных данных относительно avidности и удельной активности индивидуальных образцов ТПО вся совокупность исследуемых пациентов была разделена на две группы, в пределах каждой из которых субъекты характеризовались следующими биохимическими и клиническими показателями:

- 1) диффузный токсический зоб, высокая удельная активность фермента и нормальная avidность ($n = 10$);
- 2) полинодозный зоб с фолликулярной аденомой, пониженная удельная активность ТПО и повышенная avidность ($n = 10$).

5. *Myer L. C., Taurog A.* Purification and Iodinating Activity of Hog Thyroid Peroxidase // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. N 23. P. 5510–5523.
6. *Schacterle G. R., Pollack R. L.* A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material // *Analytical Biochemistry.* 1973. Vol. 51, N 2. P. 654–655
7. *Taurog A.* Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism // *The Thyroid*, 8th edition /Ed. by L. E. Braverman, R. D. Utiger. Philadelphia, 2000. P. 61–85.