

Sheremet M. I. Research of caspase-dependent mechanisms of apoptosis induction and the activity of peroxidation and antioxidant defense in the thyroid tissue of patients with nodular forms of goiter combined with autoimmune thyroiditis and thyroid adenoma depending on the allelic status of *Bcl-2* (*rs17759659*), *CTLA-4* (*rs231775*), *APO-1 / Fas* (*rs2234767*) genes. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(5):610-627. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.815595>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4557>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).  
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author(s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 05.05.2017. Revised: 23.05.2017. Accepted: 31.05.2017.

## RESEARCH OF CASPASE-DEPENDENT MECHANISMS OF APOPTOSIS INDUCTION AND THE ACTIVITY OF PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN THE THYROID TISSUE OF PATIENTS WITH NODULAR FORMS OF GOITER COMBINED WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS AND THYROID ADENOMA DEPENDING ON THE ALLELIC STATUS OF *Bcl-2* (*rs17759659*), *CTLA-4* (*rs231775*), *APO-1 / Fas* (*rs2234767*) GENES

M. I. Sheremet

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical  
University»

PhD, Associated Professor of Surgery Department №1,

Phone / fax (+38 0372) 55-37-54, e-mail: [office@bsmu.edu.ua](mailto:office@bsmu.edu.ua)

### Abstract

**The aim of the work** is to analyze the mechanisms of caspase-dependent apoptosis and pro- and antioxidant activity in the thyroid tissue homogenate in patients with in patients with nodular goiter with autoimmune thyroiditis and thyroid adenoma considering the polymorphic variants of BCL-2 (*rs17759659*), CTLA-4 (*rs231775*), APO-1 / Fas (*rs2234767*) genes.

**Methods of research:** We investigated pro- and antioxidant activity and the activity of caspases 3 and 8 in 5% of thyroid tissue homogenates. The BCL-2 (*rs17759659*), CTLA-4 (*rs231775*), Fas (*rs2234767*) genes polymorphism were studied by Real-Time Polymerase Chain Reaction in 95 patients with nodular goiter on the background of autoimmune thyroiditis, 30 patients with thyroid adenoma and 25 healthy individuals.

**Results:** We have not found any pronounced dependence of the processes oxidative

modification of proteins and antioxidant protection nor the activity of caspases-8 and 3 in the thyroid tissue on the genotypes of BCL-2 (rs17759659) and APO-1/Fas (rs2234767) genes. However, it should be noted that in homozygous carriers of A-allele of the BCL-2 (rs17759659) gene the activity of effector caspase-3 is higher than that in the control group. The imbalance between the activity of peroxidation and antioxidant defense in patients with nodular goiter on the background of autoimmune thyroiditis and thyroid adenoma is associated with the promoter of the CTLA-4 (rs231775) and APO-1 / Fas (rs2234767) genes and is characterized by an increasing degree of oxidative modification of proteins in the altered thyroid tissue alongside with a lower capacity of the antioxidant protection system enzymes.

**Key words: nodular goiter on the background of autoimmune thyroiditis, thyroid gland, caspases, pro - and antioxidant status, genetic association.**

УДК: 616.441-002-006.327-018.72:577.115.4:575.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ КАСПАЗО-ЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ ТА АКТИВНОСТІ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ І АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ТКАНИНІ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ПАЦІЄНТІВ НА ВУЗЛОВІ ФОРМИ ЗОБА НА ФОНІ АВТОІМУННОГО ТИРЕОЇДИТУ ТА З АДЕНОМОЮ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЗАЛЕЖНО ВІД АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ *BCL-2 (RS17759659), CTLA-4 (RS231775), APO-1/FAS (RS2234767)***

**М. І. Шеремет**

**Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»**

доцент кафедри хірургії №1

Чернівці, Україна, Театральна площа, 2

Телефон / факс (+38 0372) 55-37-54, e-mail: office@bsmu.edu.ua

**Резюме**

Метою роботи було вивчення каспазо-залежних механізмів індукції апоптозу, а також про- та антиоксидантну активність у гомогенаті тканини щитоподібної залози хворих на вузлові форми зоба на фоні автоімунного тиреоїдиту та з аденомою

щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775), APO-1/Fas (rs2234767). Отримані результати засвідчують наявність передумов для реалізації пошкоджуючої дії продуктів пероксидації на структури щитоподібної залози, а також для впливу активних форм кисню на про- та антиапоптичні мішені у т.ч і через Fas- і каспаз-залежні механізми.

**Ключові слова:** вузловий зоб на фоні автоімунного тиреоїдиту, щитоподібна залоза, каспази, про- та антиоксидантний стан, генетична асоціація.

## **Вступ**

Автоімунний тиреоїдит (АІТ) є найпоширенішим захворюванням щитовидної залози (ЩЗ) і становить 46% всієї тиреоїдної патології [1].

Захворюваність на (АІТ) з кожним роком зростає і в наступні роки очікується збереження тенденції зростання [1, 2]. Все частіше після операцій на щитовидній залозі з приводу вузлів ставиться діагноз АІТ. Разом з цим зростає число не цілком обґрунтованих операцій на залозі, причиною яких є псевдовузли або підозра на злякисну трансформацію тканини у вузлах. Все це пов'язано з труднощами діагностики самого АІТ і вузлів на тлі АІТ на доопераційному етапі. Супутній тиреоїдит значно ускладнює діагностику вузлового зоба [3].

Пошкоджуючи метаболічні порушення, накопичення в організмі різноманітних токсичних речовин зрештою призводять до оксидантного стресу, за умов якого доля клітини визначається балансом сукупності адаптаційних процесів, а також генетичними і конститутивними особливостями її біохімічних систем [4-7]. В цих умовах, окиснення ліпідів та білків клітинних мембран під впливом надлишкової продукції активних форм кисню є раннім етапом апоптозу клітини [8-10].

## **Обґрунтування дослідження**

Однак, реалізація апоптозу, механізми його індукції та регуляції залежать від низки причин: активності мітохондріальних систем енергозабезпечення клітини (внутрішній шлях апоптозу через активацію каспази 9) [8], відповідних молекулярно-генетичних чинників, які кодують роботу ферментів, стану імунного гомеостазу (зовнішній шлях апоптозу – через активацію Fas-рецепторів (CD95) і каспази 8) [9], активності процесів пероксидації, тощо [15-21]. Обидва шляхи призводять до активації ефекторних каспаз-виконавців апоптозу (каспази 3, 6, 7), що завершується деградацією ДНК і загибеллю клітини [10]. Механізми апоптичної загибелі тиреоцитів при автоімунних захворюваннях ЩЗ є предметом активного вивчення в останні десятиліття

[11-15].

Захворювання може розвиватися на тлі генетично детермінованого дефекту імунної відповіді, яка призводить до Т-лімфоцитарної агресії проти власних тиреоцитів, що закінчується їх руйнуванням. Генетична зумовленість появи АІТ підтверджується асоціацією його з антигенами системи HLA класу II, розташованими на 6 хромосомі, такими як HLA-B8, HLA-DR3 і HLA-DR5 [16-20].

Однак, даних літератури про дослідження генетичної асоціації взаємозв'язку процесів пероксидного окиснення з активацією каспазного каскаду у хворих на вузлові форми зоба на фоні автоімунного тиреоїдиту (ВЗАІТ) практично відсутні.

#### **Мета дослідження**

Метою дослідження було вивчення каспазо-залежних механізмів індукції апоптозу, а також про- та антиоксидантну активність у гомогенаті тканини щитоподібної залози хворих на вузлові форми зоба на фоні автоімунного тиреоїдиту та з аденомою щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів генів *BCL-2* (*rs17759659*), *CTLA-4* (*rs231775*), *APO-1/Fas* (*rs2234767*).

#### **Матеріали та методи дослідження**

Упродовж 2013 по 2016 рр., на базі Чернівецької обласної клінічної лікарні, обстежили 125 жінок з ВЗАІТ (вузловими формами зоба на фоні автоімунного тиреоїдиту). Вік пацієнтів коливався від 23 до 72 років. Діагноз був виставлений клінічно, лабораторно (антитіла до тиреопероксидази (АТПО) – 60-250 ОД/мл; антитіла до тиреоглобуліну (АТТГ) – 60-500 ОД/мл; тиреотропний гормон (ТТГ) – 4-10 мОД/л) за допомогою УЗД, та підтверджений гістологічно після хірургічного лікування.

Виділена група з 30 жінок, у яких за даними УЗД, тонкогальної аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ) та гістологічного заключення після операції було діагностовано аденому щитоподібної залози (АЩЗ). Група виділена в зв'язку з тим, що ця патологія є однією з найбільш розповсюджених серед вузлових форм зоба. У цих пацієнтів проводили дослідження паренхіми неураженої вузлом, морфологічно незміненої, контрлатеральної частки ЩЗ. Ці показники слугували контролем. Остаточне підтвердження морфологічно незміненої тканини отримували після гістологічного заключення.

У всіх хворих було виконано оперативне втручання. Об'єм операції – від гемітиреоїдектомії до тиреоїдектомії. Після проведеного втручання тканина ЩЗ забиралася для імуногістохімічного дослідження не пізніше ніж через 30 хв. після операції. У хворих на АЩЗ окремо брали для дослідження незмінену тканину

протилежної частки ЩЗ та аденоматозну тканину. У хворих на АІТ забирали тканину обох часток і перешийка. Шматочки тканини масою 100-300 мг доставлялися на льоду в лабораторію і відразу ж розрізали на 4-6 частин масою в середньому по 50-70 мг кожен. Після поділу закривалися в спеціальний пластиковий контейнер і зберігалися при температурі  $-70^{\circ}\text{C}$  до виконання основних досліджень.

Окремо досліджували про- та антиоксидантну активність у 5% гомогенатах тиреоїдної тканини, шляхом визначення активності глутатіонпероксидази (ГП, мкмоль/хв·г тканини), глутатіон-S-трансферази (GST, мкмоль/хв·г тканини) та ступеня окислювальної модифікації білків (ОМБ, о.о.г./г білка) за прийнятими методиками.

Для дослідження активності каспази 3 та 8 тканину щитоподібної залози подрібнювали в гомогенізаторі «WiseTis» серії HG-15 («Daihan Scientific», Південна Корея) з ротором 8 мм при швидкості 4500 об / хв. Для цього використовували середовище виділення (20 мМ HEPES, рН 7,5, 10 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ), до якого додавали коктейль інгібіторів протеаз (104 мМ AEBSF, 0,08 мМ апротинін, 1,5 мМ пепстатину А, 2 мМ лейпептину, 4 мМ бестатину, 1,4 мМ E-64) у співвідношенні 100: 1 (всі реактиви були вироблені фірмою «Sigma», США). Гомогенати центрифугували у мікроцентрифузі «Heraeus fresco 17» («Thermo Electron LED GmbH», Німеччина) при 1500 обертах упродовж 30 хв за температури  $+4^{\circ}\text{C}$ . Отриманий супернатант використовували для оцінки активності каспази-3 і каспази-8. Специфічну активність ефекторної каспази-3 та ініціаторної каспази-8 у тканині вивчали колориметричним методом на імуноферментному аналізаторі (ІФА) «Sanrise™-Tecan» (Австрія), при довжині хвилі 405 нм, за швидкістю розщеплення синтетичного субстрату N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-нітроанілін (Ac-DEVD-NHA) і N-ацетил-Ілі-Глу-Тре-Асп-нітроанілін (Ac-IETD-ІНА) відповідно. Всі реактиви, використані в даному дослідженні, були виготовлені фірмою «Sigma» (США). Активність каспаз оцінювали в мкмоль паранітроаніліну/[год • мг білка].

Виділення ДНК проводили набором реактивів Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit (#K0721, Thermo Fisher Scientific), згідно інструкції по застосуванню, з інкубацією з протеїназою К протягом ночі для повного лізису клітин. Очищену ДНК розбавили в Elution Buffer і провели оцінку якості на спектрофотометрі Nanodrop2000C. Тільки проби з концентрацією не нижче 15 нг/мкл і значеннями співвідношення A(260/280) між 1,7 і 2,0 були використані для генотипування. Отримані екстракти були розділені на аліквоти, одна з яких поміщена в холодильник при  $4^{\circ}\text{C}$  до моменту використання, а інші заморожені при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для нормалізації кількості ДНК, всі проби були приведені до концентрації 2 нг/мкл з використанням Nuclease-free water.

Для генотипування вибраних точкових поліморфізмів застосували техніку TaqMan. Вивчаються поліморфізми позначені референсним номером SNP ID, згідно бази даних dbSNP. Для тестування кожного з поліморфізмів використовували TaqMan® SN Genotyping Assays (40X) (4351379, Thermo Fisher Scientific) (табл. 1).

Таблиця 1

**Нуклеотидна послідовність регіону, що включає аналізований поліморфізм**

Референсний номер SNP ID	Номер теста (Assay ID*)	Фрагмент регіону, що включає аналізований поліморфізм
rs231775 (CTLA4)	C__2415786_20	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G]CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
rs17759659 (BCL2)	C__33628167_10	TCTTCTTACCAAAGATTTCACAATAC[A/G]GTGTTGATGGGAACGTGACCTAGTT
rs2234767 (FAS)	C__12123966_10	CAGAGTGTGTGCACAAGGCTGGCAC[A/G]CCAGGGTCTTCCTCATGGCACTAA

Примітка: згідно сайту [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

Об'єм реакційної суміші був 5 мкл і складався з: 2,5 мкл реактиву TaqMan Genotyping MasterMix (20X) (4371355, Thermo Fisher Scientific), 0,25 мкл розчину зондів і 2,25 мкл розчину ДНК. Генотипування проводилося на інструменті Quant Studio 6 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 384-лунковий блок.

Ампліфікацію проводили при наступних умовах:

Активація	10 хв	95°C	
Денатурація	15 сек	92°C	40*/60**
Відпал/ елонгація	1 хв	60°C	циклов

Примітка: \* - для ампліфікації поліморфізмів асоційованих з генами CTLA-4 і Fas; \*\* - для ампліфікації поліморфізмів асоційованих с генами Bcl-2.

Для збора даних та аналізу використовувалась програма *QuantStudio™ Real-Time PCR* (v.1.3).

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програми «Statistica 7.0» (SPSS). Номінальні дані подані у вигляді кількісних та відсоткових значень. Відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді – Вайнберга перевіряли за допомогою Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies

(<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах з різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вплив чинників на розвиток патології ЩЗ оцінювали за допомогою моделі бінарної логістичної регресії за величиною відносного ризику (RelR), відношенням ризиків (RR) і відношенням шансів (OR) з 95 % довірчим інтервалом [95 % CI] з урахуванням критерію  $\chi^2$  (df = 1). Різницю вважали достовірною при  $P < 0,05$ .

### **Результати дослідження та їх обговорення**

Ступінь окиснення білків та антиоксидантного захисту, а також активність каспаз -3 і -8 у зміненій тканині ЩЗ з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (rs17759659) наведено в таблиці 2. У тканині ЩЗ має місце вірогідне зростання параметрів ОМБ (ОМБ) на 35,50-39,58% ( $p < 0,001$ ), на тлі нижчої активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) – ГП (ГП) (на 19,57-22,41%;  $p \leq 0,002$ ) та GST (GST) (на 44,57-46,57%;  $p < 0,001$ ). Чіткої залежності ОМБ та АОЗ від поліморфізму гена *BCL-2* (rs17759659) не встановили.

Активність каспази-8 вірогідно (табл. 2) зростає в тканині ЩЗ незалежно від генотипів гена *BCL-2* (rs17759659) на 25,28-36,25% ( $p \leq 0,008$ ). А активність ефекторної каспази-3 статистично значимо підвищується тільки у гомозиготних носіїв А-алеля – на 70,41% ( $p = 0,049$ ).

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *BCL-2* (rs17759659) із показником активності системи антиоксидантного захисту ГП ( $F = 3,17$ ,  $p = 0,046$ ), а також каспазою-8, котра реалізує зовнішній Fas-залежний шлях апоптозу ( $F = 9,32$ ,  $p < 0,001$ ) (табл. 2).

Хворих на патологію ЩЗ із високим підвищенням ступеня ОМБ та активності каспаз -3, і -8 у гомогенаті тканини ЩЗ, на тлі сильного зменшенні АОЗ (>50 процентиль), було більше, ніж таких із помірним підвищенням ( $\leq 50$  процентиль) ОМБ та каспаз і зменшенням активності АОЗ – у 2,79-9 разів ( $p < 0,001$ ), відповідно, без вірогідної відмінності між генотипами гена *BCL-2* (rs17759659) (табл. 3).

**Активність каспаз -3 і -8, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (rs17759659)**

Показники	Контроль (морфологічно незмінена тканина ЩЗ), n=25	Генотипи гена <i>BCL-2</i> у хворих		
		<i>AA</i> , n=10	<i>AG</i> , n=110	<i>GG</i> , n=5
Ступінь ОМБ, о.о.г./г білка	46,51±0,46	64,18±1,95 p<0,001	63,02±2,64 p<0,001	64,92±1,97 p<0,001
Активність ГП, мкмоль / хв·г тканини	191,65±1,48	150,21±4,73 p<0,001	154,14±6,67 p=0,002	148,71±4,50 p<0,001
Активність GST, мкмоль / хв·г тканини	24,48±0,92	13,57±1,31 p<0,001	13,35±1,65 p<0,001	13,08±1,47 p<0,001
Каспаза-3, мкмоль паранітроанілін у/[год·мг білка]	0,098±0,007	0,167±0,033 p=0,049	0,148±0,036	0,153±0,038
Каспаза-8, мкмоль паранітроанілін у/[год·мг білка]	0,993±0,062	1,304±0,054 p=0,006	1,244±0,069 p=0,008	1,353±0,052 p=0,004

**Примітки:** 1. ОМБ – окислювальна модифікація білків; ГП – глутатіон-пероксидаза; GST – глутатіон-S-трансфераза; ЩЗ – щитоподібна залоза. 2. p – вірогідність різниць показників із групою контролю; p<sub>AA</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AA-генотипу; p<sub>AG</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу.

Встановили, що ступінь ОМБ у тканині ЩЗ є вищою у хворих із *A*-алелем гена *CTLA-4* (rs231775) у генотипі (табл. 4), ніж у гомозиготних носіїв мінорного *G*-алеля на 29,37% (p<sub>AA</sub>=0,005) і 32,24% (p<sub>AG</sub>=0,003), на тлі нижчої активності ферментів АОЗ: за ГП – на 14,0% (p<sub>AA</sub>=0,009) і 15,16% (p<sub>AG</sub>=0,005), за GST – на 34,31% (p<sub>AA</sub>=0,009) і 39,83% (p<sub>AG</sub>=0,004) відповідно. Аналогічну тенденцію змін спостерігали і за активністю каспази-8, яка вірогідно переважала у власників дикого *A*-алеля гена *CTLA-4* (rs231775), над показником осіб із *GG*-генотипом – на 13,56% (p<sub>AA</sub>=0,03) і 12,84% (p<sub>AG</sub>=0,041). Активність каспази-3 статистично значимо між групами спостереження не відрізнялась (табл. 4).



**Показники оксидантного стану і антиоксидантного захисту та активність каспаз - 3 і -8 у тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (rs17759659)**

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>BCL-2</i> , n=125 (%)		
		AA, n=10	AG, n=110	GG, n=5
Ступінь ОМБ	Помірне підвищення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	1 (10,0)	29 (26,36)	0
	Високе підвищення ( $> 50$ процентиль), n=95	9 (90,0)	81 (73,64)	5 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=12,80$ p<0,001	$\chi^2=49,16$ p<0,001	-
Активність ГП та GST	Помірне зменшення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	1 (10,0)	29 (26,36)	0
	Сильне зменшення ( $> 50$ процентиль), n=95	9 (90,0)	81 (73,64)	5 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=12,80$ p<0,001	$\chi^2=49,16$ p<0,001	-
Каспаза-3, Каспаза-8, од/мл	Помірне підвищення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	1 (10,0)	29 (26,36)	0
	Високе підвищення ( $> 50$ процентиль), n=95	9 (90,0)	81 (73,64)	5 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=12,80$ p<0,001	$\chi^2=49,16$ p<0,001	-

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *CTLA-4* (rs231775) із оксидантним стресом – ОМБ (F=116,41, p<0,001), активністю системи антиоксидантного захисту за ГП (F=52,36, p<0,001) і GST (F=91,37, p<0,001), а також маркером апоптозу каспазою-8, (F=16,0, p<0,001) (табл. 4).

Хворих на патологію ЩЗ із високим підвищенням ступеня ОМБ та активності каспаз -3, і -8 у гомогенаті тканини ЩЗ, на тлі сильного зменшенні АОЗ ( $> 50$  процентиль), було більше, ніж таких із помірним підвищенням ( $\leq 50$  процентиль) ОМБ та каспаз і зменшенням активності АОЗ – у 2,44-3,92 разів (p<0,001), відповідно, без вірогідної відмінності між генотипами гена *CTLA-4* (rs231775) (табл. 5).

**Активність каспаз -3 і -8, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4 (rs231775)***

Показники	Контроль (морфологічно незмінена тканина ЩЗ), n=25	Генотипи гена <i>CTLA-4</i> у хворих		
		<i>AA</i> , n=59	<i>AG</i> , n=62	<i>GG</i> , n=4
Ступінь ОМБ, о.о.г./г білка	46,51±0,46	62,59±2,18 p<0,001	63,98±1,73 p<0,001	48,38±2,84 p <sub>AA</sub> =0,005 p <sub>AG</sub> =0,003
Активність ГП, мкмоль / хв·г тканини	191,65±1,48	154,59±5,80 p=0,001	152,50±4,50 p<0,001	179,75±4,88 p=0,028 p <sub>AA</sub> =0,009 p <sub>AG</sub> =0,005
Активність GST, мкмоль / хв·г тканини	24,48±0,92	13,92±1,41 p=0,001	12,75±1,03 p<0,001	21,19±1,60 p <sub>AA</sub> =0,009 p <sub>AG</sub> =0,004
Каспаза-3, мкмоль паратітроанілін у/[год·мг білка]	0,098±0,007	0,152±0,038	0,144±0,033	0,126±0,012
Каспаза-8, мкмоль паратітроанілін у/[год·мг білка]	0,993±0,062	1,256±0,051 p=0,01	1,248±0,052 p=0,002	1,106±0,044 p <sub>AA</sub> =0,03 p <sub>AG</sub> =0,041

**Примітки:** 1. ОМБ – окислювальна модифікація білків; ГП – глутатіон-пероксидаза; GST – глутатіон-S-трансфераза; ЩЗ – щитоподібна залоза; 2. p – вірогідність різниць показників із групою контролю; p<sub>AA</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AA-генотипу; p<sub>AG</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу.

Ступінь ОМБ у зміненій тканині ЩЗ хворих на АІТ та АЩЗ, а також активність каспаз -3 і -8 перевищували показники групи контролю незалежно від генотипів гена *APO-1/Fas (rs2234767)* (табл. 6): за ОМБ – на 33,39% і 36,06% (p<0,001), за каспазою-3 – на 41,84% (p=0,007) і 54,08% (p=0,009), за каспазою-8 – на 23,46% (p=0,008) і 26,49% (p=0,01) відповідно. На цьому фоні зменшилась активність ферментів АОЗ, що також не мало залежності від поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas (rs2234767)*: за ГП – на 18,37% (p=0,001) і 19,93% (p<0,005), за GST – на 42,48% (p=0,001) і 45,59% (p<0,001) відповідно (табл. 6).

**Показники оксидантного стану і антиоксидантного захисту та активність каспаз -3 і -8 у тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (rs231775)**

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>CTLA-4</i> , n=125 (%)		
		<i>AA</i> , n=59	<i>AG</i> , n=62	<i>GG</i> , n=4
Ступінь ОМБ	Помірне підвищення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	12 (20,34)	18 (29,03)	0
	Високе підвищення ( $> 50$ процентиль), n=95	47 (79,66)	44 (70,97)	4 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=41,53$ p<0,001	$\chi^2=21,81$ p<0,001	-
Активність ГП та GST	Помірне зменшення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	12 (20,34)	18 (29,03)	0
	Сильне зменшення ( $> 50$ процентиль), n=95	47 (79,66)	44 (70,97)	4 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=41,53$ p<0,001	$\chi^2=21,81$ p<0,001	-
Каспаза-3, Каспаза-8, од/мл	Помірне підвищення ( $\leq 50$ процентиль), n=30	12 (20,34)	18 (29,03)	0
	Високе підвищення ( $> 50$ процентиль), n=95	47 (79,66)	44 (70,97)	4 (100,0)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=41,53$ p<0,001	$\chi^2=21,81$ p<0,001	-

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *APO-I/Fas* (rs2234767) із оксидантиним стресом – ОМБ (F=123,0, p=0,008), активністю системи антиоксидантного захисту за ГП і GST (F=123,0, p=0,01), а також маркерами апоптозу каспазами-3 (F=123,0, p<0,001) і -8 (F=123,0, p=0,013) (табл. 6).

Хворих на патологію ЩЗ із високим підвищенням ступеня ОМБ та активності каспаз -3, і -8 у гомогенаті тканини ЩЗ, на тлі сильного зменшенні АОЗ ( $> 50$  процентиль), було більше, ніж таких із помірним підвищенням ОМБ та каспаз і зменшенням активності АОЗ ( $\leq 50$  процентиль) – у 3,60 і 3,08 разів (p<0,001), відповідно, без вірогідної відмінності між генотипами гена *Fas* (rs2234767) (табл. 7).

Таблиця 6

**Активність каспаз -3 і -8, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas (rs2234767)***

Показники	Контроль (морфологічно незмінена тканина ЩЗ), n=25	Генотипи гена <i>Fas</i> у хворих	
		AG, n=23	GG, n=102
Ступінь ОМБ, о.о.г./г білка	46,51±0,46	62,04±2,19 p<0,001	63,28±1,96 p<0,001
Активність ГП, мкмоль / хв·г тканини	191,65±1,48	156,44±5,28 p=0,001	153,45±4,85 p<0,001
Активність GST, мкмоль / хв·г тканини	24,48±0,92	14,08±1,40 p=0,001	13,32±1,23 p<0,001
Каспаза-3, мкмоль паранітроаніліну/[год·мг білка]	0,098±0,007	0,139±0,009 p=0,007	0,151±0,014 p=0,009
Каспаза-8, мкмоль паранітроаніліну/[год·мг білка]	0,993±0,062	1,226±0,055 p=0,008	1,256±0,051 p=0,01

**Примітки:** 1. ОМБ – окислювальна модифікація білків; ГП – глутатіон-пероксидаза; GST – глутатіон-S-трансфераза; ЩЗ – щитоподібна залоза; p – вірогідність різниць показників із групою контролю; p<sub>AA</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AA-генотипу; p<sub>AG</sub> – вірогідність різниць показників із носіями AG-генотипу.

Таблиця 7

**Показники оксидантного стану і антиоксидантного захисту та активність каспаз -3 і -8 у тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas (rs2234767)***

Показники	Зміни показників, n	Генотипи гена <i>Fas</i> , n=125 (%)	
		AG, n=23	GG, n=102
Ступінь ОМБ	Помірне підвищення (≤50 центиль), n=30	5 (21,74)	25 (24,51)
	Високе підвищення (>50 центиль), n=95	18 (78,26)	77 (75,49)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=14,70$ p<0,001	$\chi^2=53,02$ p<0,001
Активність ГП та GST	Помірне зменшення (≤50 центиль), n=30	5 (21,74)	25 (24,51)
	Сильне зменшення (>50 центиль), n=95	18 (78,26)	77 (75,49)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=14,70$ p<0,001	$\chi^2=53,02$ p<0,001
Каспаза-3, Каспаза-8, од/мл	Помірне підвищення (≤50 центиль), n=30	5 (21,74)	25 (24,51)
	Високе підвищення (>50 центиль), n=95	18 (78,26)	77 (75,49)
$\chi^2$ ; p		$\chi^2=14,70$ p<0,001	$\chi^2=53,02$ p<0,001

Високе підвищення ОМБ (>50 процентиль) та активності каспаз -3, -8, за зменшення активності АОЗ (ГП і GST) підвищує ризик патології ЦЗ у 2,96 і 7,5 рази незалежно від поліморфних варіантів гена *BCL-2* (*rs17759659*), але сильніше за наявності у генотипі хворого дикого А алеля у гомозиготному стані у 7,5 разів, ніж за носійства AG, чи GG генотипів (OR=66,0; 95%CI OR=6,03-722,02; p<0,001 і OR=8,79; 95%CI OR=4,85-15,95; p<0,001) відповідно (табл. 8).

Таблиця 8

**Поліморфні варіанти гена *BCL-2* (*rs17759659*) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту**

Генотипи гена <i>BCL-2</i>		<i>RelR</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI RR</i>	<i>95%CI OR</i>	p
Підвищення ступеня ОМБ (>50 процентиль)	<i>AA</i>	7,5	66,0	2,54-22,12	6,03-722,02	<0,001
	<i>AG,GG</i>	2,96	8,79	2,13-4,13	4,85-15,95	<0,001
Зменшення активності ГП та GST(>50 процентиль)	<i>AA</i>	7,5	66,0	2,54-22,12	6,03-722,02	<0,001
	<i>AG,GG</i>	2,96	8,79	2,13-4,13	4,85-15,95	<0,001
Підвищення активності каспаз -3, 8 (>50 процентиль)	<i>AA</i>	7,5	66,0	2,54-22,12	6,03-722,02	<0,001
	<i>AG,GG</i>	2,96	8,79	2,13-4,13	4,85-15,95	<0,001

**Примітка.** *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR, OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

Аналіз поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (*rs231775*) засвідчив, що високе підвищення ступеня ОМБ та активності каспаз -3, -8 за низької активності АО (ГП і GST) стають незалежними чинниками, що підвищують ризик патології ЦЗ (АІТ та АЩЗ) у 6,64 рази, але тільки за наявності у генотипі хворого основного А-алеля гена *CTLA-4* у гомозиготному стані (*AA*-генотип) (OR=28,72; 95%CI OR=7,35-112,21; p<0,001) (табл. 9).

Зростання ОМБ, зменшення активності АОЗ, а також каспазо-залежні механізми індукції апоптозу з урахуванням поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) не підвищують вірогідно ризик АІТ і АЩЗ у популяції мешканців Північної Буковини (табл. 10).

**Поліморфні варіанти гена *CTLA-4* (rs231775) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту**

Генотипи гена <i>CTLA-4</i>	<i>RelR</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI RR</i>	<i>95%CI OR</i>	p	
Підвищення ступеня ОМБ (>50 процентиль)	<i>AA</i>	6,64	28,72	2,28-19,34	7,35-112,21	<0,001
	<i>AG,GG</i>	0,83	0,36	0,67-1,02	0,10-1,36	>0,05
Зменшення активності глутатіон-пероксидази та глутатіон-S-трансферази (>50 процентиль)	<i>AA</i>	6,64	28,72	2,28-19,34	7,35-112,21	<0,001
	<i>AG,GG</i>	0,83	0,36	0,67-1,02	0,10-1,36	>0,05
Підвищення активності каспаз -3, 8 (>50 процентиль)	<i>AA</i>	6,64	28,72	2,28-19,34	7,35-112,21	<0,001
	<i>AG,GG</i>	0,83	0,36	0,67-1,02	0,10-1,36	>0,05

**Примітка.** *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR, OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

**Поліморфні варіанти гена *APO-1/Fas* (rs2234767) як чинники ризику патології щитоподібної залози з урахуванням показників апоптозу, пероксидного окиснення білків та антиоксидантного захисту**

Генотипи гена <i>APO-1/Fas</i>	<i>RelR</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI RR</i>	<i>95%CI OR</i>	p	
Підвищення ступеня ОМБ (>50 процентиль)	<i>AG</i>	1,04	1,17	0,81-1,32	0,39-3,47	>0,05
	<i>GG</i>	0,96	0,85	0,76-1,23	0,29-2,54	>0,05
Зменшення активності ГП та GST(>50 процентиль)	<i>AG</i>	1,04	1,17	0,81-1,32	0,39-3,47	>0,05
	<i>GG</i>	0,96	0,85	0,76-1,23	0,29-2,54	>0,05
Підвищення активності каспаз -3, 8 (>50 процентиль)	<i>AG</i>	1,04	1,17	0,81-1,32	0,39-3,47	>0,05
	<i>GG</i>	0,96	0,85	0,76-1,23	0,29-2,54	>0,05

**Примітка.** *RelR* (relative risk) – відносний ризик; *OR* (Odds Ratio) – відношення шансів; *95%CI RR, OR* (confidence interval) – довірчий інтервал відношення ризиків (*RR*), шансів (*OR*).

Таким чином, дисбаланс між активністю процесів пероксидного окиснення та антиоксидантного захисту у хворих на АІТ та АЦЗ асоціюють із промотором генів *CTLA-4* (rs231775) ( $F=116,41$ ;  $p<0,001$ ) та *APO-1/Fas* (rs2234767) ( $F=123,0$ ;  $p=0,008$ ) і характеризується зростанням ступеня ОМБ у змінній тканині ЩЗ – на 33,39-39,58% ( $p<0,001$ ), за нижчої спроможності ферментів системи АОЗ: ГП – на 18,37-22,41% ( $p\leq 0,002$ ) та GST– на 42,48-46,57% ( $p\leq 0,001$ ). Чіткої залежності процесів ОМБ та АОЗ, а

також активності каспаз -8 і -3 у тканині ЩЗ від генотипів генів *BCL-2* (*rs17759659*) та *APO-1/Fas* (*rs2234767*) не встановили. Однак, необхідно зауважити, що у гомозиготних носіїв А-алеля гена *BCL-2* (*rs17759659*) активність ефекторної каспази-3 перевищує таку у групі контролю на 70,41% ( $p=0,049$ ).

### **Висновки**

1. Активність каспазо-залежних механізмів реалізації апоптозу найсильніше асоціює із промотором гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) ( $F=123,0$ ,  $p<0,001$ ), майже у 8 разів слабше (виключно за каспазою-8, котра реалізує зовнішній Fas-залежний шлях апоптозу) із поліморфним сайтом гена *CTLA-4* (*rs231775*) ( $F=16,0$ ,  $p<0,001$ ) і в 13 разів слабше із поліморфним сайтом гена *BCL-2* (*rs17759659*) ( $F=9,32$ ,  $p<0,001$ ): активність ефекторної та ініціаторної каспаз -3 і -8 перевищують показники контролю на 41,84-54,08% ( $p\leq 0,009$ ) і 23,46-36,25% ( $p\leq 0,01$ ) відповідно.

2. Поліморфні варіанти гена *CTLA-4* (*rs231775*) асоціюють з процесами пероксидного окиснення, антиоксидантного захисту та активністю ініціаторної каспази-8: у хворих із А-алелем гена *CTLA-4* (*rs231775*) ступінь ОМБ у тканині ЩЗ є вищою на 29,37% і 32,24% ( $p\leq 0,005$ ), за нижчої активності ферментів АОЗ – за ГП на 14,0% і 15,16% ( $p\leq 0,009$ ), за GST – на 34,31% і 39,83% ( $p\leq 0,009$ ) відповідно; активність каспази-8 переважає також у власників дикого А-алеля гена *CTLA-4* (*rs231775*) – на 13,56% і 12,84% ( $p\leq 0,041$ ).

3. Висока активність ОМБ (>50 центиль) та каспаз -3, -8, за зменшення інтенсивності АОЗ (ГП і GST) є незалежними чинниками, що підвищують ризик патології ЩЗ (ВЗАІТ та АЩЗ): у 2,96-7,5 рази незалежно від поліморфних варіантів гена *BCL-2* (*rs17759659*) (у 7,5 разів вищий ризик у власників АА-генотипу гена *BCL-2*:  $OR=66,0$ ; 95% CI  $OR=6,03-722,02$ ;  $p<0,001$ ); у 6,64 рази – за наявності у генотипі хворого дикого А-алеля гена *CTLA-4* (*rs231775*) у гомозиготному стані ( $OR=28,72$ ; 95% CI  $OR=7,35-112,21$ ;  $p<0,001$ ). Зростання ОМБ, зменшення активності АОЗ, а також каспазо-залежні механізми індукції апоптозу з урахуванням поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) не підвищують вірогідно ризик АІТ і АЩЗ у популяції мешканців Північної Буковини.

### **Література**

1. Vlasenko M.V. Autoimmunnyy tyreoydyt u podrostkov [Autoimmune thyroiditis in adolescents]. V kn.: 100 yzbrannykh lektsyy po éndokrynolohyy / Pod red. YU.Y. Karachentsev, A.V. Kazakova, N.A. Kravchuna, Y.M. Yl'ynoy. - Khar'kov, 2009: 372-378. (in Russian)

2. Ai J., Leonhardt J.M., Heymann W.R. Autoimmune thyroid diseases: Etiology, pathogenesis, and dermatologic manifestations. *J Am Acad. Dermatol.*, 2003, Vol.48, P.641-659.
3. Oliynyk V.A. Khronichnyy limfotsytarnyy tyroyidyt (tyreoyidyt Khashimoto): suchasnyy stan problemy [Chronic lymphocytic thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis): the current state of the problem]. *Endokrynolohiya*, 2006; 1:71-79. (in Ukrainian)
4. Andreev A.YU. Kushnareva YU.E., Starkov A.A. Metabolyzm aktyvnykh form kysloroda v mytokhondryyakh [Metabolism of active forms of oxygen in mitochondria]. *Byokhymiya*, 2005: 70, 2: 246-264. (in Russian)
5. Nekrasova T.A., Shcherbatyuk T.H., Davydenko D.V. y dr. Osobennosty perekysnoho okyslenyya lypidov y belkov pry autoymmunnom tyreoydyte bez y s mynymal'noy tyreoydnoy dysfunktsyey [Peroxide oxidation of lipids and proteins with autoimmune thyroiditis without and with minimal thyroid dysfunction]. *Klynycheskaya y éksperymental'naya tyreoydolohyya*, 2011:7, 4:38-43. (in Russian)
6. Moskaleva E. YU. S. E. Severyn Vozmozhnye mekhanizmy adaptatsyy kletky k povrezhdenyyam, yndutsyruyushchym prohammyrovannuyu hybel'. Svyaz' s patolohyey [Possible mechanisms of adaptation of the cell to Injuries causing programmed death. Communication with pathology]. *Patolohycheskaya fyzyolohyya y éksperymental'naya terapiya*, 2006, 2: 2-14. (in Russian)
7. Nedosekova YU.V., Urazova O.Y., Kravets E.B., Chaykovskyy A.V. Rol' apoptoza v razvytyy autoymmunnykh zabolevanyy shchytovydnoy zhelezy [The role of apoptosis in the development of autoimmune diseases of the thyroid gland]. *Byulleten' sybyrskoy medytsyny*, 2009, 4, 2: 64 – 71. (in Russian)
8. Myshunina T.M., Kalinichenko O.V., Tron'ko M.D. Mekhanizmy apoptozu klityn shchytopodibnoyi zalozy za umov yiyi patolohiyi [Mechanisms of apoptosis of thyroid gland cells under conditions of its pathology]. *Fiziol. zhurn.*, 2009, 55, 6: 90-102. (in Ukrainian)
9. Myshunina T. M., Kalinichenko O. V., Tron'ko M. D. ta in. Mitokhondrial'ni ta postmitokhondrial'ni mekhanizmy apoptozu u tkanyni shchytopodibnoyi zalozy z oznakamy limfoyidnoyi infil'tratsiyi chy khronichnoho tyroyidytu [Mitochondrial and postmitochondrial mechanisms of apoptosis in a thyroid gland with signs of lymphoid infiltration or chronic thyroiditis]. *Endokrynolohiya*, 2009, 14, 1: 48-56. (in Ukrainian)
10. Erdamar H., Demirci H., Yaman H. et al. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status



// Clin. Chem. Lab. Med. - 2008. – Vol.46, № 7. - P. 1004-1010.

11. Novytskyy, V.V., Ryazantseva, N.V., Chasovskykh, N.YU. y dr. Modulyatsyya apoptoza mononuklearov v uslovyakh oksylytel'noho stressa [Modulation of apoptosis of mononuclear cells under conditions of oxidative stress]. Byul. ékspery. byol. y med., 2008, 3: 251-254. (in Russian)

12. Bretz J.D., Baker J.R. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? // Clin. Endocrinol.2001. Vol. 55, №1, P. 1–11.

13. Łacka K., Maciejewski M., Współczesne poglądy na temat etiopatogenezy autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, (choroby Hashimoto) //Pol. Merk. Lek., - 2011. V.30. N.176. P. 132-138.

14. Łacka K., Maciejewski A. Rola procesu apoptozy w etiopatogenezie autoimmunologicznego zapalenia tarczycy // Pol. Merk. Lek., - 2012. Vol.32, N. 188. P. 87-92.

15. Sheremet M.I., Sydoruk L.P., Shidlovskiy V.O., Bedenyuk A.D. Research of prognostic markers of proliferation and apoptosis in patients with nodular goiters combined with autoimmune thyroiditis // Archives of the Balkan Medical Union. - Vol. 51, № 4, P. 488-491.

16. Sheremet M. I., Sydoruk L. P., Shidlovskiy V. O., Bedenyuk A. D. et all. Effect of APO-1 / FAS, CTLA-4 AND BCL-2 genes polymorphisms on the risk of goiter nodular forms with autoimmune thyroiditis occurrence among the bukovinian population / // Archives of the Balkan Medical Union.- Vol. 52, № 2, P. 11-18

17. Zhang M, Ni J, Xu WD et al. Association of CTLA-4 variants with susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Hum Immunol. 2014, 75, N3, 227-233.

18. Qiu H, Tang W, Yin P, Cheng F, Wang L. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 polymorphism and Hashimoto's thyroiditis susceptibility: a meta-analysis. Endocrine 2014, 45; 2:198-205.

19. Biktagirova EM, Kravtsova OA, Sattarova LI, Vagapova GR. Influence of polymorphisms of CTLA-4 and PTPN-22 genes on developmental risk autoimmune thyroiditis among the population of the Republic of Tatarstan. Medical immunology. 2010; 12 (1-2): 103-114 [in Russian].

20. Pastuszak-Lewandoska D, Sewerynek E, Domańska D et al. CTLA-4 gene polymorphisms and their influence on predisposition to autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). Arch Med Sci 2012, 8;3:415-421.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest concerning this article.

**Acknowledgement** This research is part of a first author's doctoral dissertation submitted to I.Y. Horbachevsky State Medical University, Ternopol, Ukraine, under the direction of Professor **L.P. Sydorchuk and V.O. Shidlovskyi.**