

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Ахметовой Венеры Турсиновны на тему «Совершенствование изучения гетерогенности эпитопов антитиреопероксидазных аутоантител у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы»

**представленной на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по
образовательной программе 6D110100 - Медицина**

Актуальность темы исследования

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы, являются наиболее распространенными органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями. В частности, примерно у 1% населения в течение жизни может развиваться диффузный токсический зоб, а у ~15% взрослых женщин диагностирован аутоиммунный тиреоидит (Caturegli P. et. al.,2007, Hollowell J.G. et. al.,2002). При данных патологиях происходят аутоиммунные перекресты, которые характеризуются комбинацией клинических, биохимических и серологических проявлений, свойственных нескольким заболеваниям этого органа, данный симптомокомплекс называют синдром перекреста или «overlap-syndrome» (Генделека Г.Ф., 2014, Anaya J.M. et. al., 2016, Edit B. Et. al., 2006)

Термин синдром перекреста означает, что у одного больного наблюдаются признаки двух различных аутоиммунных заболеваний, имеющих, вероятно, общий патогенез. Факторы, определяющие баланс между диффузным токсическим зобом и аутоиммунным тиреоидитом, неизвестны.

Основными антигенами, имеющими значение в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, являются тиреоглобулин (ТГ), антитела к тиреопероксидазе (АТкТПО) и антитела к рецептору тиреотропного гормона (АТ к РТТГ).

Антитела к ТПО и антитела к рецептору ТТГ в сыворотке крови больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы направлены к различным участкам фермента. С помощью моноклональных антител к тиреоидной пероксидазе изучена эпитопная специфичность к определенным участкам молекулы тиреоидной пероксидазы.

Выяснение причин подобной гетерогенности эпитопов у больных с различными нарушениями щитовидной железы может уточнить патофизиологические механизмы развития аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

На сегодняшний день известно, что линейные и конформационные эпитопы, имеют решающее значение для развития аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Имеющиеся зарубежные исследования убедительно свидетельствуют о том, что у разных лиц эпитопы не одинаковы, и при этом распространенность аутоиммунных заболеваний щитовидной железы продолжает увеличиваться, что требует дальнейшего изучения.

Подтверждение важности изучения специфических эпитопов имеет клиническое значение, поскольку оно может предложить терапевтические возможности за счет использования моноклональных антител к тиреоидной пероксидазе (Зубков А.В., и др., 2011, McLachlan S.M. et. al., 2017).

В последние годы наблюдается заметный прогресс в изучении механизма, лежащего в основе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Были продемонстрированы исследования по идентификации Т- и В-клеточных эпитопов, *in silico*, *in vitro*, *in vivo* и в клинических экспериментах (Inaba H. et. al., 2006, Lee H.J. et. al., 2015).

В настоящее время исследование гетерогенности эпитопов анти тиреопероксидазных аутоантител у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы не проводилось в условиях неблагоприятной экологии и йодной недостаточности. На основании проведенных исследований и проведенного мета анализа, были предложены ключевые идеи патогенеза и лечения диффузного токсического зоба и аутоиммунного тиреоидита. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения и уточнения сдвигов в звеньях иммунологических систем, а также провести дифференциальную диагностику между диффузным токсическим зобом, аутоиммунным тиреоидитом и синдромом перекреста и на этой основе разработать алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с учетом гетерогенности эпитопов.

В развитии и прогрессировании аутоиммунных заболеваний щитовидной железы важную роль также играют цитокины. Чтобы понять роль цитокинов в инициации или подавлении аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, важно понять иммунологические события, которые запускают аутоиммунный ответ, что в конечном итоге приводит к ассоциированной патологии. Цитокины модулируют реакции воспаления и иммунитета, регулируя рост, подвижность и дифференцировку лимфоидных и нелимфоидных клеток. Особый интерес для изучения этиологии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы представляют ИЛ-10 (ИЛ-10) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) (Balaji V. et. al., 2011).

Разработанный диагностический алгоритм на основе оценки прогностической значимости гетерогенности эпитопов моноклональных антител при различных аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы позволил значительно оптимизировать диагностические и лечебные вмешательства у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

Цель исследования: Разработать эффективные критерии диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы путем изучения гетерогенности эпитопов анти тиреопероксидазных аутоантител у больных с АИЗЩЖ с использованием моноклональных антител к тиреоидной пероксидазе.

Задачи исследования

1. Провести эпидемиологическую оценку аутоиммунных заболеваний щитовидной железы по ВК,СКО,ЮКО,ЗКО.
2. Оценить гетерогенность эпитопов антитиреопероксидазных аутоантител у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы с использованием моноклональных антител к тиреоидной пероксидазе.
3. Установить роль цитокинов – ИЛ-10, ФНО- α в формировании аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.
4. Разработать алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с использованием моноклональных антител.

Дизайн исследования

Поперечное исследование включало 398 пациентов с диагнозами: диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреоидит и синдром перекреста (overlap-syndrome). Пациенты были включены в исследование в период с 1 января 2016 года по 31 декабря 2019 года.

Участники исследования были включены из списка пациентов, наблюдавшихся эндокринологами в амбулаторных условиях. Прежде чем было принято решение о включении в исследование, каждый пациент был проконсультирован двумя экспертами в области эндокринологии. Эта консультация включала верификацию диагноза, объективное клиническое обследование, анализы функции щитовидной железы и ультразвуковое исследование щитовидной железы, при необходимости проводилась тонкоигольная биопсия щитовидной железы с последующим цитологическим исследованием по Папаниколау для исключения злокачественных новообразований. Одни и те же исследователи осматривали каждого пациента каждые шесть месяцев, чтобы контролировать его / ее состояние.

Изучалось функциональное состояние щитовидной железы: Тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (свТ4), антитела к тиреопероксидазе (АТ к ТПО), антитела к рецептору тиреотропного гормона (АТрТТГ), и ультразвуковое исследование (УЗИ) проводились всем пациентам до включения в исследование и при каждом последующем посещении в течение периода исследования.

Эпитопы при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и константы связывания тиреопероксидазы с моноклональными антителами были изучены в лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Российская Федерация.

Мы использовали 8 МкАТ для ТПО, из которых пять реагировали с нативными ТПО и остальные реагировали с денатурированным ТПО.

Критерии включения:

- Пациенты находящиеся на диспансерном учете у эндокринолога с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в поликлиниках;

- Повышенные показатели антител к тиреопероксидазе от 200 МЕ/мл и выше при АИТ;
- Наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- Воспалительные заболевания верхних дыхательных путей и другие воспалительные заболевания.
- Злокачественные новообразования щитовидной железы.
- Отсутствие информированного согласия на участие в исследовании или отказ от участия на любом этапе до завершения анализа.

Исследование, включало 398 пациентов, подавляющее большинство пациентов были женщинами как в подгруппе АИТ (93,3 %) и в подгруппе ДТЗ (70,7 %). Средний возраст пациентов был очень похож: 47,77 года для пациентов с АИТ и 45,75 года для пациентов с ДТЗ.

Все статистические тесты проводились в статистическом программном обеспечении SPSS 20.

Количественные переменные были представлены в виде медианы с 25-м – 75-й перцентилем в случаях асимметричного распределения и как среднее \pm стандартное отклонение, когда распределение данных было близко к нормальному. Качественные данные были представлены в виде абсолютных цифр и процентов. Для сравнения количественных переменных использовался U-критерий Манна-Уитни, в то время как для сравнения качественных переменных использовался критерий χ^2 Пирсона. Уровень значимости наблюдаемых различий был представлен как $p < 0,05$.

Материалы и методы исследования

1. Для проведения исследования отобраны образцы сывороток крови обследуемых, с лабораторно и инструментально подтвержденным диагнозом аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.
2. Изучение эпитопов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и констант связывания тиреоидной пероксидазы с моноклональными антителами и аутоантителами проведены в лаборатории иммунной эндокринологии НИИ им. И.И.Мечникова. г. Москва.
3. Определение интерлейкинов – ИЛ-10, ФНО- α с помощью твердофазового ИФА;
4. УЗИ щитовидной железы и тонкоигольная биопсия щитовидной железы с последующим цитологическим исследованием по Папаниколау;
5. Гормональное исследование; – тиреотропного гормона, свободный Т4, АТ к тиреоидной пероксидазе, антитела к рецепторам ТТГ.

Научная новизна

1. Впервые изучена гетерогенность эпитопов, распознаваемых антителами к ТПО, у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в Казахстане, в мировой тиреологии при синдроме перекреста (overlap-

syndrome) нам не удалось найти ни одного исследования гетерогенности эпитопов АТкТПО. Данное исследование можно рассматривать как первую попытку получить представление о специфичности эпитопов при синдроме перекреста (overlap-syndrome).

2. Доказано, что выраженное ингибирование связывания МкАТ 82 при синдроме перекреста (overlap-syndrome) можно рассматривать как один из потенциальных маркеров благоприятного течения диффузно токсического зоба.

3. Установлено что повышенные показатели ФНО- α могут рассматриваться в качестве предикторов тяжести клинического течения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

Статически значимых различий в уровне ИЛ-10 между пациентами с гипо- и гиперфункцией щитовидной железы, функциональным статусом щитовидной железы не было обнаружена статистически значимой и корреляционной связи.

4. Разработан алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с использованием моноклональных антител.

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту

1. Выявлена тенденция увеличения заболеваемости аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в различных регионах Казахстана: Восточном Казахстане, Северо-Казахстанской области, Южно-Казахстанской области, Западно-Казахстанской области.

2. Выраженное ингибирование связывания МкАТ 82 при синдроме перекреста можно рассматривать как один из потенциальных маркеров благоприятного течения диффузно токсического зоба. Ингибирование связывания МкАТ 63 в сыворотке крови пациентов с аутоиммунным тиреоидитом более значительно, чем таковые в сыворотке пациентов с диффузно токсическим зобом.

3. Повышенный уровень ФНО- α может рассматриваться в качестве предиктора тяжести клинического течения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

4. Статически значимых различий в уровне ИЛ-10 между пациентами с гипо- и гиперфункцией щитовидной железы, функциональным статусом щитовидной железы не было обнаружена статистически значимой и корреляционной связи.

5. Разработан алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с использованием моноклональных антител.

Практическая значимость

1. Диагностика синдрома перекреста (overlap-syndrome) с применением диагностического биомаркера МкАТ 82.

2. Рекомендован алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний

щитовидной железы с использованием моноклональных антител.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проанализирована научная литература по теме диссертации, а также данные статистики региональных поликлиник.

Диссертантом самостоятельно в лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», исследована гетерогенность аутоантител методом конкурентного ИФА с использованием конъюгатов МкАТ.

Диссертантом изучена специфичность аутоантител к ТПО, обобщены результаты, проведена статистическая обработка полученных данных. Все разделы диссертации цели, задачи и программы исследования, сбор и обработка материала, разработка основных положений диссертации, заключения, выводы и практические рекомендации сформулированы и написаны автором самостоятельно.

Выводы:

1. Анализ показателей заболеваемости за 2016-2020 годы по данным проведённого скрининга выявило, общий прирост аутоиммунных заболеваний щитовидной железы по Восточному Казахстану 46,8 % , Южно-Казахстанской области 44,1% , Северо-Казахстанской области 45,5%, Западно-Казахстанской области 43,61%. Чаще аутоиммунные заболевания щитовидной железы встречаются у лиц со средним возрастом $47,18 \pm 14,99$ лет. Подавляющее большинство пациентов были женщинами как в подгруппе АИТ (93,3 %) и в подгруппе ДТЗ (70,7 %).

2. Выраженное ингибирование связывания МкАТ 82 при синдроме перекреста (overlap-syndrome) можно рассматривать как один из потенциальных маркеров благоприятного течения диффузно токсического зоба. Аутоантитела в сыворотке крови пациентов с аутоиммунным тиреоидитом ингибировали связывание МкАТ 63 более значительно, чем таковые в сыворотке крови пациентов с диффузно токсическим зобом. Это различие позволяет предположить, что МкАТ 63 является перспективным дополнительным биомаркером АИТ.

3. Статистический анализ показал, что ИЛ-10 выше нормы у 19,4% пациентов, у 80,5% показатели нормальные. Статистически же показатели ИЛ-10 выше у пациентов с диагнозом аутоиммунный тиреоидит. После использования критерий согласия χ^2 Пирсона статически значимых различий в уровне ФНО α между пациентами с гипо- и гиперфункцией щитовидной железы, функциональным статусом щитовидной железы и местом проживания не было обнаружена статистически значимой и корреляционной связи. Но при этом в общей группе ФНО- α повышен у 48,9% пациентов у 50,3% пациентов показатели нормальные.

4. Разработан алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с использованием моноклональных антител. Предложенный алгоритм позволяет обеспечить своевременную диагностику синдрома перекрёста (overlap-syndrome) на основе патогенетических различий, где рекомендовано что при обнаружении выраженного ингибирования МкАТ82 при диффузно токсическом зобе, не требуется агрессивная терапия с развитием таких возможных осложнений, как гипопаратиреоз, тетания, тяжёлый гипотиреоз, парез голосовых связок. Обнаружение выраженного ингибирования МкАТ82 может иметь полезную диагностическую ценность в качестве дополнительного диагностического инструмента для постановки диагноза синдром перекрёста в самые ранние сроки, что может снизить частоту осложнений аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

Практические рекомендации

1. Изучение гетерогенности эпитопов антипероксидазных аутоантител у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы рекомендуется к применению в практической медицине для диагностики синдрома перекрёста (overlap-syndrome) с применением диагностического биомаркера МкАТ 82.
2. Предложен алгоритм диагностики и лечения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы с использованием моноклональных антител.

Сведения о публикациях

По теме диссертационного исследования опубликовано 10 научных трудов, среди которых:

- 1 статья в базе Scopus «Journal of Clinical & Translational Endocrinology» Volume 27, March 2022, 100293, издательство Elsevier Inc.;
- 3 в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК (2 статьи в журнале «Астана медициналық журналы» и 1 статья в журнале «Вестник КазНМУ»);
- 6 тезиса опубликованы в сборнике зарубежной конференции и в материалах международных конференции;

Апробация результатов диссертации

Материалы исследования были представлены и обсуждены на следующих конференциях:

- «Proceedings of the 6th International Scientific and Practical Conference international forum: problems and scientific solutions» Мельбурн, Австралия 2020г;
- «Proceedings of the 2 nd International Scientific and Practical Conference global and regional aspects of sustainable development» Копенгаген, Денмарк 26-28.02.2021г;

12-th International Congress on Autoimmunity, Афины, Греция, 28 Май -1 Июнь, 2021, A study on the immune system traits in the pathogenesis of Graves disease and autoimmune thyroiditis, № 1842;

13-th International Congress on Autoimmunity, Athens, Greece, 10-13 June, 2022 , Heterogeneity of antibody-reactive epitopes to thyroid peroxidase in patients with autoimmune diseases and overlap syndrome #372 Topic: AS45 #372 Topic: AS45, Thiroid autoimmunity;

VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием "VolgaMedScience", ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, 17-18 марта 2022 года в городе Нижнем Новгороде;

Международная конференция в Токио, Япония. Scientific advances and innovative approaches Proceedings of the I International Scientific and Practical Conference 01-02 Декабрь 2022;

XIII Международной научно-практической конференция «Наука и образование в современном мире: Вызовы ххi века» Республика Казахстан, г. Астана. 27-31 Май 2023 год;

Участие с публикацией тезиса на 3 конференциях республиканского уровня международного значения:

Республиканская научно-практическая конференция г. Семей с международным участием «Обязательное социальное медицинское страхование – повышение эффективности системы здравоохранения» 25 сентября 2020 года;

Республиканская научно-практической конференции с международным участием «Эндокринологические заболевания: современные подходы в диагностике и лечении» г. Семей, Республика Казахстан 14 ноября 2019 г.;

Конференция молодых ученых «Наука и здоровье», посвященной 70-летию члена-корреспондента НАЕН Республики Казахстан, профессора Дюсупова А.З. и ассоциированного профессора Дюсуповой Б.Б.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 88 страницах, состоит из введения, 3 разделов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций, библиографического списка, включающего 219 наименований отечественной, русскоязычной и зарубежной литературы, содержит 7 таблиц, 13 рисунков.