

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

State Institution «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Ендокринологія

ENDOKRYNOLOGIA

2017

TOM 22, № 4
VOLUME 22, No. 4

Науково-практичний медичний журнал
Scientific medical journal

Заснований у квітні 1996 р.
Founded in April 1996

Виходить 4 рази на рік



Загальнодержавна реферативна база даних «Україніка наукова»

УРЖ «Джерело»

Київ
Kyiv

© ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», 2017
© Видавничий дім Медкнига, 2017

Ендокринологія

ENDOKRYNOLOGIA

2017

Том 22, № 4

Volume 22, No. 4

Засновник: Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»
State Institution «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine»

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 14099-3070 ПР від 17.06.2008

Наказом МОН України від 07.10.2015 р. № 1021 журнал внесено до

Переліку наукових фахових видань України (медичні та біологічні науки)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

ТРОНЬКО М.Д. [головний редактор]
КВАЧЕНЮК А.М., СОКОЛОВА Л.К. [заступники головного редактора з клінічної ендокринології]
МИКОША О.С. [заступник головного редактора з експериментальної ендокринології]
ГИРЯВЕНКО О.Я. [відповідальний секретар]
Богданова Т.І., Боднар П.М., Большова О.В., Гульчій М.В., Зубкова С.Т., Караченцев Ю.І.,
Коваленко А.Є., Ковзун О.І., Корпачев В.В., Кравченко В.І., Луцицький Є.В., Маньковський Б.М.,
Науменко В.Г., Орленко В.Л., Полторак В.В., Пушкарьов В.М., Резніков О.Г.

РЕДАКЦІЙНА РАДА:

Боцюрко В.І. (Івано-Франківськ), Вендзилович Ю.М. (Львів), Власенко М.В. (Вінниця), Войнілович В.О. (Чернігів),
Кирилюк М.Л. (Київ), Ларін О.С. (Київ), Мельниченко Г.О. (Російська Федерація), Спринчук Н.А. (Київ), Ткач С.М. (Київ),
Томас Дж. (Велика Британія), Хатч М. (США), Шестакова М.В. (Російська Федерація), Ямашіта С. (Японія)

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»,
вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна
тел.: (044) 430-36-94, факс: (044) 428-19-96
E-mail: iem_admi@bigmir.net

Повнотекстову версію журналу представлено на сайті <http://www.endokrynologia.kiev.ua>

Електронні копії опублікованих статей передаються до Національної бібліотеки

ім. В.В. Вернадського для вільного доступу в режимі on-line

Затверджено вченою радою ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В.П. Комісаренка НАМН України» от 19.09.2017 (протокол № 11)

Редакція не завжди поділяє думки авторів статей. Відповідальність за достовірність, добір та викладення фактів у статтях несуть автори.

*Правову відповідальність за розміщення, зміст, достовірність та графічне відтворення рекламно-інформаційних матеріалів про лікарські засоби чи пристрої
несе виробник, дистриб'ютор або інша структура, яка надала відповідні матеріали.*

*Передрук та інше відтворення в будь-якій формі в цілому або частково статей, ілюстрацій та інших матеріалів дозволено тільки з попередньою
письмовою згодою редакції та з обов'язковим посиланням на джерело. Усі права захищено.*

Видавець: Видавничий дім Медкнига, www.medkniga.kiev.ua

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи в державний реєстр видавців видавничої продукції ДК №3066 від 20.12.2007

Керівник проекту — О.П. Влас, тел. (066) 785-11-56

Відділ маркетингу — Т.Г. Овчаренко (066) 753-81-78, (067)-847-85-05

Адреса: вул. Вишгородська, 12, м. Київ, 04074, Україна

Тел./факс: (044) 485-15-86

Підписано до друку 24.11.2017. Наклад 4000 прим.

Обсяг до 12 ум. др. арк., 24 обл.-вид. арк.

© ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», 2017

© Видавничий дім Медкнига, 2017

Асоціація поліморфізму генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775), APO-1/Fas (rs2234767) з активністю проліферації й апоптозу в тиреоїдній тканині хворих із вузловими формами зоба

М.І. Шеремет¹,
Л.П. Сидорчук¹,
В.О. Шідловський²,
А.Д. Беденюк²,
Г.С. Курочкін³,
А.В. Левицький³

¹Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна

²Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, м. Тернопіль, Україна

³Державний університет медицини та фармації ім. Н. Тестеміцану, м. Кишинів, Молдова

Резюме. Мета — порівняльний аналіз процесів апоптозу та проліферативної активності у вузловій і псевдовузловій тканині щитоподібної залози (ЩЗ) у хворих на вузловий зоб на тлі аутоімунного тиреоїдиту (ВЗАІТ) та аденому щитоподібної залози (АЩЗ) та в морфологічно незміненій тканині шляхом дослідження експресії/щільності маркерів Fas/FasL, Bcl-2, p53 і Ki-67 на тиреоцитах і підрахунку кількості імунореактивних клітин, які експресують зазначені маркери, що регулюють апоптоз і проліферацію за ВЗАІТ та АЩЗ, із використанням імуногістохімічного методу, з урахуванням поліморфізму генів BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) і APO-1/Fas (rs2234767).

Встановлено, що у хворих на ВЗАІТ та АЩЗ активуються декілька ланок механізму апоптозу тиреоцитів із перевагою Fas-індукованої, що асоціюється з геном BCL-2 (rs17759659) і майже в 6 разів слабше з промотором гена CTLA-4 (rs231775), через виражену експресію Fas і FasL на поверхні клітин вузлової та псевдовузлової тканини ЩЗ (частіше в носіїв GG-генотипу гена BCL-2 — на 18,54% і 36,18% відповідно), що свідчить про ініціацію зовнішнього шляху апоптозу через каспазний механізм (ефекторну каспазу 8).

Ключові слова: вузловий зоб, аутоімунний тиреоїдит, аденома щитоподібної залози, поліморфізм APO-1/Fas, CTLA-4 і BCL-2 генів.

* Адреса для листування (Correspondence): Буковинський державний медичний університет, Театральна площа, 2, м. Чернівці, 58002, Україна.
E-mail: zdovado@ukr.net

© М.І. Шеремет, Л.П. Сидорчук, В.О. Шідловський, А.Д. Беденюк, Г.С. Курочкін, А.В. Левицький

Вступ

Захворюваність на аутоімунний тиреоїдит (АІТ) із кожним роком зростає, наступними роками очікується збереження цієї тенденції [1-5]. Дедалі частіше після операцій на ЩЗ із приводу вузлів діагностується ВЗАІТ [6-9]. Водночас зростає число не цілком обґрунтованих операцій на залозі, причиною яких є псевдовузлі або підозра на злоякісну трансформацію тканини. Все це пов'язано з труднощами діагностики самого АІТ і вузлів на його тлі на передопераційному етапі. Супутній АІТ значно ускладнює діагностику вузлового зоба.

Одним із механізмів пухлинної трансформації та прогресії є порушення регуляції клітинного циклу з пригніченням апоптозу та активацією проліферації. Перспективним внутрішньоклітинним маркером проліферації є білок Ki-67, антитіла до якого розпізнають ДНК-зв'язаний ядерний протеїн, наявний в ядрах клітин на стадіях клітинного циклу, за винятком G0 і початкової стадії G1. Після виходу клітин із мітичного циклу антиген не виявляється [3, 7-9]. Діагностично значущим онкомаркером є білок p53, що експресується в усіх клітинах організму, активується після ушкоджень генетичного апарату, а також унаслідок стимулів, які можуть призвести до подібних пошкоджень, або є сигналом несприятливого стану клітини (стресу). Результатом його активації є зупинка клітинного циклу та реплікації ДНК, а за надмірного стресового сигналу — запуск апоптозу. Функція антиапоптичного білка p53 полягає у видаленні з пулу потенційно онкогенних клітин. Майже в 50% випадків злоякісних пухлин людини, в тому числі й ЩЗ, діагностують втрату функції білка p53 [10, 11-13, 17].

Загибель клітин опосередковується також взаємодією поверхневих клітинних рецепторів Fas/FasL або CD95L (трансмембранний протеїн II типу, що належить до сімейства чинників некрозу пухлин (TNF), який експресується на цитотоксичних Т-лімфоцитах) й активується через каспазний механізм запуску апоптозу. Це є важлива ланка патологічного процесу для підтримки гомеостазу клітин імунної системи та захисних сил організму. Апоптоз через систему Fas/FasL є також важливим шляхом знищення цитотоксичних Т-клітин [14-17].

Окрім того, дослідженнями останніх років доведено, що мутації, надто регуляторних генів, спричиняють розвиток тиреопатій, у тому числі АІТ [18, 19]. Важливу роль у розвитку АІТ відіграє поліморфізм генів інгібіторів активації Т-лімфоцитів CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4) і PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22). Ген *CTLA4* розглядається як один із найбільш імовірних генів-кандидатів, асоційованих з аутоімунними захворюваннями ЩЗ [9, 16, 22, 23]. CTLA-4, також відомий як CD152, — член суперсімейства імуноглобулінів, експресується на активованих Т-лімфоцитах і є ко-стимулюючою молекулою. CTLA4, подібно CD28, зв'язується з CD80 і CD86 на антиген-презентуючих клітинах і діє як негативний регулятор Т-клітинної активації. За даними низки авторів, поліморфні варіанти генів *CTLA-4* і PTPN-22 є маркерами генетичної схильності до АІТ [20-24].

Описано поліморфізм інших генів, які впливають на функцію ЩЗ: ген регулятора апоптозу *BCL-2* (B-cell lymphoma 2) (*rs17759659*), *APO-1/Fas* (apoptosis antigen 1 / cluster of differentiation 95 (CD95) (*rs2234767*)), локуси, асоційовані з АІТ, наявні на хромосомах 2 (2q33), 6 (6p21), 8 (8q24), 12 (12q22) і 13 (13q32), тощо [25-29].

Натомість оцінка маркерів, які регулюють апоптоз (білок p53, Bcl-2, Fas-система), маркерів проліферації (білок Ki-67), а також їх зв'язок із поліморфізмом генів, що асоціюються з апоптозом, роль у цьому процесі аутоімунних реакцій є недостатньо вивченими та вимагають подальших досліджень.

Мета дослідження — вивчення показників апоптозу та проліферації (експресія/щільність) маркерів Fas/FasL, Bcl-2, p53 і Ki-67 на клітинах у ділянках лімфоїдної інфільтрації та деструкції тиреоцитів, а також у морфологічно незмінених ділянках тканини ЩЗ (контроль), і підрахунок кількості імунореактивних клітин, які експресують зазначені маркери, що регулюють апоптоз і проліферацію за АІТ та АЩЗ, із використанням імуногістохімічного методу, з урахуванням поліморфізму генів *BCL-2* (*rs17759659*), *CTLA-4* (*rs231775*) і *APO-1/Fas* (*rs2234767*).

Матеріали та методи

Упродовж 2013-2016 рр. на базі Чернівецької обласної клінічної лікарні обстежено 125 жінок із хірургічною патологією ЩЗ, в 95 з яких діагностовано ВЗАІТ. Вік пацієнтів коливався від 23 до 72 років. Діагноз було встановлено клінічно, лабораторно (АТПО — 60-250 ОД/мл; АТТГ — 60-500 ОД/мл; ТТГ — 4-10 мОД/л) за допомогою імуноферментного аналізу; за допомогою УЗД ЩЗ (форма, розміри, ехоцильність, наявність об'ємних утворень) і підтверджено морфологічно після хірургічного лікування.

Серед пацієнтів виділено групу з 30 жінок, у яких за даними УЗД, тонкогोलкової аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ) і гістологічного дослідження після операції було діагностовано аденому ЩЗ. Цю групу виділено через значне поширення цієї патології серед вузлових форм зоба. У даній групі проводили дослідження паренхіми, неураженої вузлом, морфологічно незміненої, контрлатеральної частки ЩЗ. Ці показники були контролем.

Усім хворим виконано оперативне втручання за загальноприйнятими показаннями. Обсяг операції — від гемітиреоїдектомії до тиреоїдектомії. Після проведеного втручання тканину ЩЗ забирали для імуногістохімічного дослідження не пізніше ніж за 30 хв по операції. У хворих на АЩЗ окремо брали для дослідження незмінену тканину протилежної частки ЩЗ та аденоматозну тканину. У хворих на ВЗАІТ забирали уражену вузлову тканину. Шматочки тканини масою 100-300 мг доправляли на льоду в лабораторію й одразу розрізали на 4-6 частин масою в середньому по 50-70 мг кожен, закривали в спеціальний пластиковий контейнер і зберігали за температури -70°C до виконання основних досліджень.

Заморожені фрагменти тканини переміщали на предметне скло, роздрібнювали скальпелем на маленькі шматочки у фосфатно-солевому буфері (ФСБ), збирали в пластикову пробірку об'ємом 5-10 мл, додаючи 1-2 мл ФСБ, що містив 0,25% розчин трипсину та ЕДТА 1 ммоль. Інкубували 2 години за температури 37°C у режимі постійного перемішування. Струшували на гомогенізаторі фірми Vortex і переливали рідину в конічну пробірку через нейлонові фільтри Filcons діаметром 35-

50 мкм фірми Partec (Німеччина). Відмивали суспензію 2 рази у ФСБ і за допомогою центрифугування ресуспендували осад, додаючи або видаляючи необхідну кількість ФСБ до кінцевої концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин у літрі. Кінцеву концентрацію визначали на апараті MICROS60-ot фірми ABX DIAGNOSTICS (Франція), який дозволяє розрахувати загальну кількість клітин за їх розмірами. З отриманої гетерогенної суспензії готували цитологічний препарат, який досліджували з метою підтвердження виданих раніше гістологічних висновків про належність препарату певним нозологіям.

В імуногістохімічних реакціях використовували моноклональні антитіла до таких антигенів: Mouse Human Ki-67 FITC Clone MIB-1; Anti-p53 Protein Monoclonal Antibody, FITC Conjugated, Clone DO-7; Mouse Anti-Human Apoptosis Regulator Bcl-2 (BCL2) Monoclonal, Unconjugated, Clone 124 antibody; Mouse Anti-Human CD95 Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone FAS18; Mouse Anti-Human CD95L Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone NOK-1 фірми Dako Denmark A/S (Данія).

Щільність експресії мембранних/внутрішньоклітинних рецепторів оцінювали в умовних одиницях (у.о.) за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI), пропорційною номеру каналу, виміряного в логарифмічному режимі.

Для підрахунку клітин оцінювали показники проліферації та апоптозу в ділянках дослідження, використовуючи гейтування (рис.), коли визначається вікно, куди потрапляють клітини розміром до 25 мкм.

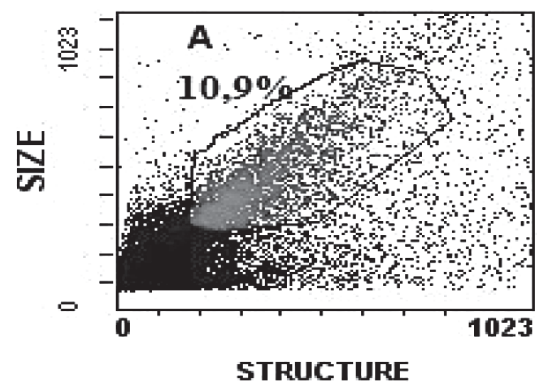


Рис. Гістограма зони дослідження гетерогенної суспензії тканини ЩЗ з обмеженою зоною гейтування (А).

Оригінальні дослідження

Визначали кількість клітин та їх щільність із маркерами, розподіленими на поверхні клітин, Fas, FasL і внутрішньоклітинних маркерів проліферації Ki-67 та апоптозу Bcl-2, p53. Фенотипування проводили на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur фірми BD Biosciences (США) з підрахунком 100 000 клітин у зразку і розрахунком відносної кількості клітин, а також показника щільності експресії рецепторів на клітинах або групі клітин. Цифрові дані (гістограми) у вигляді файлів (LMD) аналізували спеціальною аналітичною програмою СХР ver.2.2.

Генетичні дослідження виконували в лабораторії генетики на базі Державного університету медицини та фармації ім. М. Тестеміцану (Республіка Молдова).

Для проведення генетичних досліджень в усіх пацієнтів і донорів (n=25) забирали по 1 мл цільної венозної крові, дотримуючи всіх правил біоетики. Венозну кров зберігали в пробірках із K2-EDTA.

Виділення ДНК проводили набором реактивів Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit (#K0721, Thermo Fisher Scientific) згідно з інструкцією, з інкубацією з протеїназою K упродовж ночі для цілковитого лізису клітин. Очищену ДНК розбавляли в Elution Buffer і проводили на спектрофотометрі Nanodrop2000C. Лише проби з концентрацією не нижче від 15 нг/мкл і співвідношенням A(260/280) між 1,7 і 2,0 використовували для генотипування. Отримані екстракти розділяли на аліквоти, одну з яких поміщали в холодильник (4°C) до моменту використання, а інші заморожували за -20°C. Усі проби доводили до концентрації ДНК 2 нг/мкл.

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

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

Таблиця 1. Нуклеотидна послідовність регіону, що включає аналізований поліморфізм

Референт-ний номер тесту SNP ID	Номер тесту (Assay ID*)	Фрагмент регіону, що включає аналізований поліморфізм
rs231775 (CTLA4)	C_2415786 _20	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G] CCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCT
rs17759659 (BCL2)	C_33628167 _10	TCTTCTTACCAAAGATTCAACAATAC[A/G] GTGTTGATGGGAACGTGACCTAGTT
rs2234767 (FAS)	C_12123966 _10	CAGAGTGTGTGCAACAAGGCTGGCAC[A/G] CCCAGGGTCTTCTCATGGCACTAA

Примітка: згідно з даними сайту www.thermofisher.com [30-32].

Ампліфікацію проводили за таких умов:

Активіація	10 хв	95°C	
Денатурація	15 с	92°C	40*/60**
Відпал/елонгація	1 хв	60°C	циклів

Примітка: * — для ампліфікації поліморфізмів, асоційованих із генами CTLA-4 і Fas; ** — для ампліфікації поліморфізмів, асоційованих із генами Bcl-2.

Для аналізу використовували програму QuantStudio™ Real-Time PCR (v.1.3).

Основну частину статистичного аналізу проведено з використанням програми Statistica 7.0 (SPSS). Номінальні дані наведено у вигляді кількісних і відносних 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 і контрольній групах застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Вірогідність відмінностей середніх величин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вплив чинників на розвиток патології ШЗ оцінювали за допомогою моделі бінарної логістичної регресії за величиною відносного ризику (RelR), відношенням ризиків (RR) і відношенням шансів (OR) із 95% довірчим інтервалом [95% CI] з урахуванням критерію χ^2 (df=1). Різницю вважали вірогідною за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Кількість клітин і щільність рецепторів із маркерами, розподіленими на поверхні клітин (Fas, FasL), і внутрішньоклітинних маркерів проліферації (Ki-67) та апоптозу (Bcl-2, p53) з урахуванням поліморфних варіантів гена Bcl-2 (rs17759659) наведено в табл. 2. Кількість імунореактивних клітин, які експресують

на поверхні трансмембранний білок Fas, була вірогідно більшою в гомозиготних носіїв мінорної G-алелі гена *BCL-2*, ніж у носіїв основної A-алелі (AA- і AG-генотипи) на 18,54% ($p_{AA}=0,043$) і 36,18% ($p_{AG}=0,018$). За рештою показників (кількість клітин із рецепторами до FasL і внутрішньоклітинних маркерів апоптозу p53, Bcl-2 і проліферації Ki-67, а також щільність цих маркерів як на поверхні, так і всередині клітини) з урахуванням поліморфізму гена *BCL-2* (*rs17759659*) не встановлено вірогідної різниці з контролем. За результатами порівняння з референтними значеннями контрольної групи загалом встановили у хворих на патологію ШЗ вірогідно вищі показники кількості клітин із рецепторами до Fas, FasL, Bcl-2 і Ki-67 ($p<0,055-0,001$). Натомість щільність рецепторів Fas і FasL на поверхні тиреоцитів, навпаки, була вірогідно нижчою, ніж у контролі ($p<0,05$), що не мало залежності від поліморфних варіантів гена *BCL-2*. Показники проліферації Ki-67 та апоптозу через білки Bcl-2 і p53 у хворих на ВЗАІТ та АЩЗ із щільністю відповідних білків всередині клітини вірогідно перевищували такі в групі контролю ($p<0,05$).

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *BCL-2* (*rs17759659*) із кількістю клітин, що експресують Bcl-2 ($F=7,25$, $p<0,001$), p53 ($F=10,58$, $p<0,001$), Fas ($F=25,33$, $p<0,001$), FasL ($F=7,18$, $p=0,001$), Ki-67 ($F=3,60$, $p=0,03$), щільністю рецепторів FasL ($F=9,74$, $p<0,001$) і маркера проліферації білка Ki-67 ($F=13,20$, $p<0,001$).

Щільність рецепторів і кількість імунореактивних клітин-маркерів апоптозу та проліферації в тканині ШЗ з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (*rs231775*) наведено в таблиці 2.

Щільність внутрішньоклітинного білка, що регулює процес проліферації, Ki-67 вірогідно переважала в носіїв мінорної алелі G (AG-, GG-генотипи) гена *CTLA-4* над такою в носіїв AA-генотипу на 10% ($p=0,033$) і 11,5% ($p=0,046$) відповідно. За рештою маркерів вірогідних відмінностей залежно від поліморфізму гена *CTLA-4* (*rs231775*) не встановлено. Кількість клітин із рецепторами до Fas, FasL і Ki-67, а також щільність внутрішньоклітинних антиапоптичних білків (p53 і Bcl-2) і проліферації (Ki-67) вірогідно переважали значення контрольної групи ($p\leq 0,048-0,001$).

Таблиця 2. Щільність рецепторів і кількість клітин-маркерів апоптозу та проліферації в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *BCL-2* (*rs17759659*), M \pm m

Показник	Контроль (морфологічно незмінена тканина ШЗ), n=25	Генотипи за геном <i>BCL-2</i>		
		AA (n=10)	AG (n=110)	GG (n=5)
Кількість клітин Fas, %	0,79 \pm 0,04	23,28 \pm 2,30 $p<0,001$	18,24 \pm 3,89 $p<0,001$	28,58 \pm 0,55 $p_{AA}=0,043$ $p_{AG}=0,018$
Щільність рецепторів Fas, у.о.	13,82 \pm 0,40	6,75 \pm 1,25 $p<0,001$	7,38 \pm 1,12 $p<0,001$	6,45 \pm 0,95 $p<0,001$
Кількість клітин FasL, %	3,85 \pm 0,16	11,93 \pm 1,71 $p=0,003$	10,57 \pm 1,34 $p=0,002$	12,14 \pm 1,45 $p=0,002$
Щільність рецепторів FasL, у.о.	11,13 \pm 0,85	7,57 \pm 0,96 $p=0,009$	8,29 \pm 0,64 $p=0,009$	7,34 \pm 0,39 $p=0,005$
Загальна кількість клітин p53, %	64,14 \pm 1,89	67,79 \pm 1,27	59,47 \pm 7,0	68,02 \pm 1,52
Щільність білка p53, (загальна), у.о.	1,41 \pm 0,05	3,46 \pm 0,93 $p=0,035$	3,86 \pm 0,58 $p=0,004$	3,60 \pm 0,94 $p=0,028$
Кількість клітин Ki-67, %	1,16 \pm 0,05	4,26 \pm 0,53 $p=0,001$	3,73 \pm 0,81 $p=0,001$	4,46 \pm 1,40 $p=0,026$
Щільність білка Ki-67, у.о.	1,20 \pm 0,07	1,77 \pm 0,18 $p=0,006$	2,11 \pm 0,22 $p=0,005$	1,88 \pm 0,24 $p=0,012$
Кількість клітин Bcl-2, %	73,05 \pm 1,35	80,66 \pm 2,99 $p=0,027$	78,22 \pm 2,44 $p=0,055$	81,23 \pm 3,47 $p=0,037$
Щільність білка Bcl-2, у.о.	3,86 \pm 0,16	7,18 \pm 1,57 $p=0,043$	6,62 \pm 1,07 $p=0,013$	7,40 \pm 1,49 $p=0,026$

Примітка: p — вірогідність різниці з контрольним показником;
 p_{AA} — вірогідність різниці з показником носіїв AA-генотипу;
 p_{AG} — вірогідність різниці з показником носіїв AG-генотипу.

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *CTLA-4* (*rs231775*) із кількістю клітин, що експресують p53 ($F=8,35$, $p<0,001$), Fas ($F=4,23$, $p=0,017$), FasL ($F=5,61$, $p=0,005$), Ki-67 ($F=3,72$, $p=0,027$), і щільністю рецепторів Fas ($F=17,17$, $p=0,001$), антиапоптичних Bcl-2 ($F=3,09$, $p=0,049$) і p53 ($F=18,18$, $p<0,001$) і маркера проліферації білка Ki-67 ($F=56,26$, $p<0,001$) (табл. 3).

Оригінальні дослідження

Таблиця 3. Щільність рецепторів та кількість клітин-маркерів апоптозу і проліферації в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *CTLA-4* (*rs231775*), $M \pm m$

Показник	Контроль (морфологічно незмінена тканина ЩЗ), n=25	Генотипи за геном <i>CTLA-4</i>		
		AA (n=59)	AG (n=62)	GG (n=4)
Кількість клітин Fas, %	0,79±0,04	18,62±4,20	18,90±4,02	12,81±1,25
Щільність рецепторів Fas, у.о.	13,82±0,40	7,48±1,32	7,10±1,80	10,12±1,05
Кількість клітин FasL, %	3,85±0,16	10,64±1,40	10,81±1,26	8,52±1,18
Щільність рецепторів FasL, у.о.	11,13±0,85	8,20±0,61	8,15±0,57	8,19±0,47
Загальна кількість клітин p53, %	64,14±1,89	61,46±4,39	58,39±5,26	65,03±2,90
Щільність білка p53, (загальна), у.о.	1,41±0,05	3,71±0,41	4,01±0,35	3,03±0,56
Кількість клітин Ki-67, %	1,16±0,05	3,71±0,62	3,89±0,63	3,09±0,77
Щільність білка Ki-67, у.о.	1,20±0,07	2,0±0,08	2,20±0,11	2,23±0,08
Кількість клітин Bcl-2, %	73,05±1,35	78,49±3,24	78,40±2,36	77,21±4,82
Щільність білка Bcl-2, у.о.	3,86±0,16	6,61±0,60	6,79±0,64	6,08±1,0

Примітка: p — вірогідність різниці з контрольним показником;
 p_{AA} — вірогідність різниці з показником носіїв AA-генотипу;
 p_{AG} — вірогідність різниці з показником носіїв AG-генотипу.

Показники щільності рецепторів і кількість клітин-маркерів апоптозу та проліферації в тканині ЩЗ не мали прямої залежності від поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) (табл. 4). Кількість клітин із рецепторами до Fas, FasL і Ki-67, а також щільність внутрішньоклітинних антиапоптичних білків (p53 і Bcl-2) і проліферації (Ki-67) вірогідно перевищували показники групи контролю ($p \leq 0,019-0,001$).

Однофакторний дисперсійний аналіз підтвердив асоціацію промотора гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) із кількістю клітин, що експресують FasL ($F=8,37$, $p=0,005$), і щільністю рецепторів Fas ($F=115,28$, $p<0,001$) і внутрішньоклітинного протеїну p53 ($F=10,62$, $p=0,001$).

Таблиця 4. Щільність рецепторів і кількість клітин-маркерів апоптозу і проліферації в тканині щитоподібної залози з урахуванням поліморфних варіантів гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*), $M \pm m$

Показник	Контроль (морфологічно незмінена тканина ЩЗ), n=25	Генотипи за геном <i>APO-1/Fas</i>	
		AG (n=23)	GG (n=102)
Кількість клітин Fas, %	0,79±0,04	17,70±4,35	18,75±4,25
Щільність рецепторів Fas, у.о.	13,82±0,40	7,10±1,80	10,12±1,05
Кількість клітин FasL, %	3,85±0,16	7,95±1,17	7,25±1,02
Щільність рецепторів FasL, у.о.	11,13±0,85	10,30±1,42	10,73±1,33
Загальна кількість клітин p53, %	64,14±1,89	60,83±4,59	60,09±4,83
Щільність білка p53, (загальна), у.о.	1,41±0,05	3,58±0,41	3,87±0,38
Кількість клітин Ki-67, %	1,16±0,05	3,72±0,66	3,79±0,63
Щільність білка Ki-67, у.о.	1,20±0,07	2,02±0,20	2,09±0,21
Кількість клітин Bcl-2, %	73,05±1,35	78,34±2,63	78,42±1,81
Щільність білка Bcl-2, у.о.	3,86±0,16	6,49±0,63	6,70±0,58

Примітка: p — вірогідність різниці з контрольним показником;
 p_{AA} — вірогідність різниці з показником носіїв AA-генотипу;
 p_{AG} — вірогідність різниці з показником носіїв AG-генотипу.

За частотою збільшення (помірна, висока) або зменшення кількості клітин і щільності рецепторів, що експресують маркери апоптозу та проліферації, з урахуванням поліморфізму гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) встановлено тенденції, аналогічні наведеним у табл. 3, з різницею в частоті 3,08 і 3,60 раза ($p<0,001$), без вірогідних відмінностей за поліморфними варіантами гена *Fas* (*rs2234767*).

Аналіз маркерів апоптозу та проліферації як чинників ризику виникнення досліджуваної патології ЩЗ засвідчив, що високе компенсаторне підвищення кількості клітин у тканині, що експресують Fas, FasL і Ki-67, і помірне — клітин із Bcl-2 на тлі значного зменшення щільності рецепторів на поверхні клітин із Fas і FasL і підвищення щільності всередині клітини антиапоптичного протеї-

ну Vcl-2 підвищує ризик патології ЩЗ (АІТ та АЩЗ) у 2,79 і 9 разів у носіїв АG- і, надто, АА-генотипів гена *BCL-2* (*rs17759659*) відповідно (OR=7,80 і OR=81,0; $p<0,001$; **табл. 5**). Натомість значне підвищення щільності білка проліферації Ki-67 на тлі сильного (>50 процентиль) і помірного (≤ 50 процентиль) зменшення кількості клітин, що містять протеїн онкосупресії p53 і Vcl-2 білок, є чинником протекції та робить ризик появи АІТ та АЩЗ найнижчим в обстеженій популяції мешканців Північної Буковини незалежно від генотипів гена *BCL-2* (OR=0,01; 95% CI OR: 0,001-0,23 для АА-генотипу і OR=0,13; 95% CI OR: 0,07-0,23 — для АG-генотипу; $p<0,001$).

Таблиця 5. Поліморфні варіанти гена *BCL-2* (*rs17759659*) як чинники ризику апоптозу та проліферації в тканині щитоподібної залози пацієнтів із патологією ЩЗ (n=125)

Показник	Генотип за геном BCL-2	RelR	OR	95% CI RR	95% CI OR
Кількість клітин Fas, FasL і Ki-67, % (значне підвищення)	AA	9,0	81,0	1,38-58,44	4,36-1504,5
	AG	2,79	7,80	2,0-3,89	4,28-14,21
Щільність рецепторів Fas і FasL, у.о. (значне зменшення)	AA	9,0	81,0	1,38-58,44	4,36-1504,5
	AG	2,79	7,80	2,0-3,89	4,28-14,21
Щільність білка Ki-67, у.о. (значне підвищення)	AA	0,11	0,01	0,02-0,72	0,001-0,23
	AG	0,36	0,13	0,26-0,50	0,07-0,23
Загальна кількість клітин p53, % (значне зменшення)	AA	0,11	0,01	0,02-0,72	0,001-0,23
	AG	0,36	0,13	0,26-0,50	0,07-0,23
Кількість клітин Vcl-2, % (помірне зменшення)	AA	0,11	0,01	0,02-0,72	0,001-0,23
	AG	0,36	0,13	0,26-0,50	0,07-0,23
Кількість клітин Vcl-2, % (помірне збільшення)	AA	9,0	81,0	1,38-58,44	4,36-1504,5
	AG	2,79	7,80	2,0-3,89	4,28-14,21
Щільність білка Vcl-2, у.о. (значне підвищення)	AA	9,0	81,0	1,38-58,44	4,36-1504,5
	AG	2,79	7,80	2,0-3,89	4,28-14,21

Примітка: RelR (relative risk) — відносний ризик; OR (Odds Ratio) — відношення шансів; 95% CI RR, OR (confidence interval) — довірчий інтервал відношення ризиків (RR), шансів (OR), $p<0,001$ для усіх показників.

Методами клінічної епідеміології встановили, що аналізовані маркери апоптозу та проліферації в тканині ЩЗ (високий вміст у тканині клітин, що експресують Fas, FasL, Ki-67, Vcl-2, значне зменшення щільності рецепторів на поверхні клітин із Fas і FasL і значне зростання щільності протеїну Vcl-2) підвищують ризик патології ЩЗ (АІТ та АЩЗ) у 3,92 рази в носіїв АА-генотипу гена *CTLA-4* (OR=15,34; 95% CI OR: 6,26-37,60; $p<0,001$), у 2,44 рази — в осіб із АG-генотипом гена *CTLA-4* (OR=5,98; 95% CI OR: 2,75-12,98; $p<0,001$) (**табл. 6**), в 3,08 рази — в гомозиготних носіїв основної G-алелі гена *APO-1/Fas* (*rs2234767*) (**табл. 7**) й у 3,60 рази — в гетерозиготних носіїв АG-генотипу цього гена (OR=9,49; 95% CI OR:

Таблиця 6. Поліморфні варіанти гена *CTLA-4* (*rs231775*) у тканині щитоподібної залози пацієнтів із патологією ЩЗ (n=125)

Показник	Генотипи за геном CTLA-4	RelR	OR	95% CI RR	95% CI OR
Кількість клітин Fas, FasL і Ki-67, % (значне підвищення)	AA	3,92	15,34	2,33-6,60	6,26-37,60
	AG	2,44	5,98	1,61-3,72	2,75-12,98
Щільність рецепторів Fas і FasL, у.о. (значне зменшення)	AA	3,92	15,34	2,33-6,60	6,26-37,60
	AG	2,44	5,98	1,61-3,72	2,75-12,98
Щільність білка Ki-67, у.о. (значне підвищення)	AA	0,25	0,07	0,15-0,43	0,03-0,16
	AG	0,41	0,17	0,27-0,62	0,08-0,36
Загальна кількість клітин p53, % (значне зменшення)	AA	0,25	0,07	0,15-0,43	0,03-0,16
	AG	0,41	0,17	0,27-0,62	0,08-0,36
Кількість клітин Vcl-2, % (помірне зменшення)	AA	0,25	0,07	0,15-0,43	0,03-0,16
	AG	0,41	0,17	0,27-0,62	0,08-0,36
Кількість клітин Vcl-2, % (помірне збільшення)	AA	3,92	15,34	2,33-6,60	6,26-37,60
	AG	2,44	5,98	1,61-3,72	2,75-12,98
Щільність білка Vcl-2, у.о. (значне підвищення)	AA	3,92	15,34	2,33-6,60	6,26-37,60
	AG	2,44	5,98	1,61-3,72	2,75-12,98

Примітка: RelR (relative risk) — відносний ризик; OR (Odds Ratio) — відношення шансів; 95% CI RR, OR (confidence interval) — довірчий інтервал відношення ризиків (RR), шансів (OR), $p<0,001$ для усіх показників.

Оригінальні дослідження

Таблиця 7. Поліморфні варіанти гена *APO-1/Fas (rs2234767)* як чинники ризику апоптозу і проліферації в тканині щитоподібної залози пацієнтів із патологією ЩЗ (n=125)

Показник	Генотип за геном APO-1/Fas	RelR	OR	95% CI RR	95% CI OR
Кількість клітин Fas, FasL і Ki-67, % (значне підвищення)	AG	3,60	12,96	1,61-8,05	3,19-52,62
	GG	3,08	9,49	2,15-4,41	5,01-17,96
Щільність рецепторів Fas і FasL, у.о. (значне зменшення)	AG	3,60	12,96	1,61-8,05	3,19-52,62
	GG	3,08	9,49	2,15-4,41	5,01-17,96
Щільність білка Ki-67, у.о. (значне підвищення)	AG	0,28	0,08	0,12-0,62	0,02-0,31
	GG	0,32	0,11	0,23-0,46	0,06-0,20
Загальна кількість клітин p53, % (значне зменшення)	AG	0,28	0,08	0,12-0,62	0,02-0,31
	GG	0,32	0,11	0,23-0,46	0,06-0,20
Кількість клітин Bcl-2, % (помірне зменшення)	AG	0,28	0,08	0,12-0,62	0,02-0,31
	GG	0,32	0,11	0,23-0,46	0,06-0,20
Кількість клітин Bcl-2, % (помірне збільшення)	AG	3,60	12,96	1,61-8,05	3,19-52,62
	GG	3,08	9,49	2,15-4,41	5,01-17,96
Щільність білка Bcl-2, у.о. (значне підвищення)	AG	3,60	12,96	1,61-8,05	3,19-52,62
	GG	3,08	9,49	2,15-4,41	5,01-17,96

Примітка: RelR (relative risk) — відносний ризик; OR (Odds Ratio) — відношення шансів; 95% CI RR, OR (confidence interval) — довірчий інтервал відношення ризиків (RR), шансів (OR), $p < 0,001$ для усіх показників.

5,01-17,96 і OR=12,96; 95% CI OR: 3,19-52,62; $p < 0,001$ відповідно).

Чинниками, які зменшують імовірність появи АІТ та АЩЗ в обстежених незалежно від генотипів генів *CTLA-4 (rs231775)* та *APO-1/Fas (rs2234767)*, є (табл. 6, 7): високе компенсаторне підвищення щільності білка проліферації Ki-67 і редукція кількості клітин, що містять протеїни p53 або Bcl-2 (OR=0,07-0,17; 95% CI OR: 0,03-0,36; $p < 0,001$ і OR=0,08-0,11; 95% CI OR: 0,02-0,31; $p < 0,001$ відповідно).

Отже, у хворих на АІТ та АЩЗ активуються декілька ланок програмованого кілінгу тиреоцитів із перевагою апоптозу, який найсильніше асоціює з промотором гена *BCL-2 (rs17759659)* ($F=25,33$; $p < 0,001$) і майже в 6 разів слабше — з промотором гена *CTLA-4*

($rs231775$) ($F=4,23$, $p=0,017$) через виражену експресію Fas і FasL на поверхні клітин у ділянках лімфоїдної інфільтрації та деструкцію тиреоцитів (сильніше в носіїв GG-генотипу гена *BCL-2* — на 18,54% ($p_{AA}=0,043$) і 36,18% ($p_{AG}=0,018$) відповідно), що свідчить про ініціацію зовнішнього шляху апоптозу через каспазний механізм (ефекторну каспазу 8).

Висновки

1. Підвищена експресія Bcl-2 у лімфоцитах ЩЗ хворих на ВЗАІТ і АЩЗ асоціює з промоторним регіоном гена *BCL-2 (rs17759659)* за результатами однофакторного дисперсійного аналізу з невірогідними змінами експресії білка p53.
2. У хворих на ВЗАІТ та АЩЗ збільшується кількість імунореактивних клітин, які експресують Ki-67, і щільність даного протеїну, яка найсильніше асоціює з поліморфним сайтом гена *CTLA-4* і майже в 4 рази слабше — з промотором гена *BCL-2*.
3. Високий вміст у тканині ЩЗ пацієнтів з її хірургічною патологією клітин, що експресують Fas, FasL, Ki-67, Bcl-2, на тлі зменшення щільності рецепторів Fas і FasL на поверхні клітин та значного зростання щільності протеїну Bcl-2 підвищують ризик патології ЩЗ (АІТ та АЩЗ): у 2,79 і 9 разів — у носіїв AG- і, надто, AA-генотипів гена *BCL-2 (rs17759659)* відповідно; у 2,44 та 3,92 рази — в носіїв AG- і AA-генотипів гена *CTLA-4*; в 3,08 та 3,60 рази — в гомозиготних носіїв основної G-алелі та AG-генотипу гена *APO-1/Fas* відповідно.
4. Чинниками протекції, які зменшують імовірність виникнення ВЗАІТ та АЩЗ в обстеженій популяції мешканців Північної Буковини незалежно від генотипів аналізованих генів є: підвищення щільності білка проліферації Ki-67 і редукція кількості клітин, що містять протеїни p53 або Bcl-2.

Список використаної літератури

1. Калоева АА, Боташева ВС, Эркенова ЛД. Характер морфологических изменений при эндемическом зобе. Фундаментальные исследования. 2015;1(1):30-40. (Kaloyeva AA, Botasheva VS, Erkenova LD. Character of morphological changes during endemic goiter. Fundamental'nyye issledovaniya. 2015;1(1):30-40).
2. Brix TH, Hegedus L. Twin studies as a model for exploring the

- aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(4):457-64.
3. Бондаренко ОО, Шпонька ИС, Гриценко ПА. Использование онкомаркеров в морфологической диагностике эпителиальных опухолей щитовидной железы. *Морфология*. 2010;3(2):12-6. (Bondarenko OO, Shpon'ka IS, Gritsenko PA. The use of tumor markers in the diagnosis of morphological epithelial tumors of thyroid gland. *Morfologiya*. 2010;3(2):12-6).
 4. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid*. 2010;20(7):715-25.
 5. Dong YH, Fu DG. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(23):3611-8.
 6. Tsyganenko OS, Voroschuk RS. Immunomorphological reaction in the thyroid tissue in patients with autoimmune thyroiditis in combination with nodular goiter. *Acta Medica. Nicholas Anestiadi, Tenth Congress of the Association of Surgeons of Moldova, Chisinau*. 2007;4(25):51-2.
 7. Sheremet MI, Sydorhuk LP, Shidlovskiy VO, Bedenyuk AD. Research of prognostic markers of proliferation and apoptosis in patients with nodular goiters combined with autoimmune thyroiditis. *Archives of the Balkan Medical Union*. 2016; 51(4):488-91.
 8. Sheremet MI, Sydorhuk LP, Shidlovskiy VO, Bedenyuk AD, Pashkovska N V, Leonova MO, et al. New prognostic markers of nodular forms of goiter combined with autoimmune thyroiditis. *Journal of Education, Health and Sport* 2017;7 (3):475-82.
 9. Sheremet MI, Shidlovskiy VO, Sydorhuk LP. Assessment of proliferation and apoptosis markers in patients with autoimmune thyroiditis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016;6(1):179-88.
 10. Хази́ев ИВ, Сорокина ВВ. Экспрессия онкомаркеров Ki-67 и p53 у фолликулярных неоплазиях щитовидной железы. *Экспериментальная и клиническая медицина*. 2013;59(2):77-81. (Khazyev IV, Sorokina VV. Expression of tumor markers Ki-67 and p53 in follicular thyroid neoplasia. *Eksperymentalna i klinichna medytsyna*. 2013;59(2):77-81).
 11. Мужичук ОВ, Винник ЮО, Васько АР, Горбенко ВМ, Гартин ВВ. Молекулярно-генетичні аспекти тиреоїдного канцерогенезу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014;3;2 (111):44-9. (Muzhychuk OV, Vinnyk YuO, Vas'ko AR, Horbenko VM, Harhin VV. Molecular-genetic aspects of thyroid carcinogenesis. *Visnyk problem biologiyi i medytsyny*, 2014;3;2 (111):44-9).
 12. Мужичук ОВ, Афанасьева НІ, Мужичук ВВ. Значення прогностичних маркерів пухлинної прогресії P53, P21^{WAF1/CIP1}, P63 та KI-67 в пухлинах щитовидної залози. *Вісн. Харк. нац. ун-ту*. 2009;18(879):4-9. (Muzhychuk OV, Afanas'yeva NI, Muzhychuk VV. The value of prognostic markers of tumor progression P53, P21^{WAF1/CIP1}, P63 and KI-67 in thyroid tumors. *Visn. Khark. nats. un-tu*. 2009;18(879):4-9).
 13. Choudhury M. Diagnostic utility of Ki-67 and p53 immunostaining on solitary thyroid nodule – a cytohistological and radionuclide scintigraphic study. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;54(3):472-5.
 14. Andrikoula M, Kolaitis N, Vartholomatos G, Tsatsoulis A. Serum levels of soluble Fas in patients with multinodular goiter. *Immunol Invest*. 2009;38(5):398-407.
 15. Basolo F, Fiore L, Baldanzi A, Giannini R, Dell'Omodarme M, Fontanini G, et al. Suppression of Fas expression and down-regulation of Fas ligand in highly aggressive human thyroid carcinoma. *Lab. Invest*. 2000 Sep;80(9):1413-9.
 16. Chistiakov DA. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis*; 2005;2:1-21.
 17. Kazakov SP, Kushlinsky NYe. The investigation of CD95, p53, bcl-2 and Ki-67 markers in autoimmune thyroid pathology patients. *First Joint Meeting of European National Societies of Immunology Under the auspices of EFIS and 16th European Congress of Immunology: ECI*. 2006. Sept. 6-9; Paris, France: 547.
 18. Eschler DC, Hasham A, Tomer Y. Cutting edge: the etiology of autoimmune thyroid diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;13:33-9.
 19. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1600-8.
 20. Биктагірова ЭМ, Кравцова ОА, Саттарова ЛИ, Вагапова ГР. Влияние полиморфизмов генов CTLA-4 и PTPN-22 на риск развития аутоиммунного тиреоидита среди населения республики Татарстан. *Медицинская иммунология*. 2010;12(1-2):103-14. (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. *Meditinskaya limnologiya*. 2010;12(1-2):103-14).
 21. Zhang M, Ni J, Xu WD, Wen PF, Qiu LJ, Wang XS, et al. Association of CTLA-4 variants with susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014 Mar;75(3):227-33.
 22. Pastuszak-Lewandoska D, Sewerynek E, Domańska D, Gładys A, Skrzypczak R, Brzezińska E. CTLA-4 gene polymorphisms and their influence on predisposition to autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). *Arch Med Sci*. 2012 Jul 4;8(3):415-21.
 23. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. CTLA-4 and TNF- α promoter-308 A/G polymorphisms and ANCA-associated vasculitis susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):319-26.
 24. Ni J, Qiu LJ, Zhang M, Wen PF, Ye XR, Liang Y, et al. CTLA-4 CT60 (rs3087243) polymorphism and autoimmune thyroid diseases susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *Endocr Res*. 2014;39(4):180-8.
 25. Man-Man Lu, Qian-Ling Ye, Chen-Chen Feng, Jie Yang, Tao Zhang, Jing LI, et al. Association of FAS gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A case-control study and meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2012 Sep; 4(3):497-502.
 26. 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.
 27. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19075-80.
 28. Kochetova OV, Gaynullina MK, Viktorova TV. DIO2, TPO, CYP1A1 AND CYP1A2 gene polymorphism in women with thyroid disease. *Gig Sanit*. 2014;3:52-6.
 29. Gözü HI, Özçelik S, Aloğlu M, Şahin A, Temiz S, Dayan A, et al. Is the TSHR D727E polymorphism a genetic predisposition for multinodular goiter in the Turkish population? *Genet Mol Res*. 2016 Aug 5;15(3):385-90.
 30. Population Diversity (Alleles in Ref SNP orientation). / dbSNP Short Genetic Variation // NCBI. – 2017. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=rs17759659.
 31. Population Diversity (Alleles in Ref SNP orientation). / dbSNP Short Genetic Variation // NCBI. – 2017. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=231775.
 32. Population Diversity (Alleles in Ref SNP orientation). / dbSNP Short Genetic Variation // NCBI. – 2017. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=2234767.

(Надійшла до редакції 18.08.2017 р.)

Оригінальні дослідження

Ассоциация полиморфизма генов BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775), APO-1/Fas (rs2234767) с активностью пролиферации и апоптоза в тиреоидной ткани больных с узловыми формами зоба на фоне аутоиммунного тиреоидита и аденомы щитовидной железы

М.И. Шеремет¹, Л.П. Сидорчук¹, В.А. Шидловский²,
А.Д. Беденюк², Г.С. Курочкин³, А.В. Левицкий³

¹ Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

² Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского, г. Тернополь, Украина

³ Государственный университет медицины и фармации им. М. Тестемицану, г. Кишинёв, Молдова

Резюме. Цель — сравнительный анализ процессов апоптоза и пролиферации в ткани щитовидной железы (ЩЖ) у больных узловым зобом на фоне аутоиммунного тиреоидита (УЗАИТ) и аденомой щитовидной железы (АЩЖ) по сравнению с морфологически неизменной тканью путем исследования экспрессии/плотности маркеров Fas/FasL, Bcl-2, p53 и Ki-67 на тиреоцитах в участках лимфоидной инфильтрации и их деструкции, а также в морфологически неизменных участках тиреоидной ткани, и подсчет количества иммунореактивных клеток, которые экспрессируют указанные маркеры, с использованием иммуногистохимического метода, с учетом полиморфизма генов BCL-2, CTLA-4 и APO-1/Fas. **Результаты.** Установлено, что у больных УЗАИТ и АЩЖ активируются несколько звеньев программируемого киллинга тиреоцитов с преимуществом Fas-индуцированного апоптоза, который ассоциирует с промотором гена BCL-2 и почти в 6 раз слабее с промоторного гена CTLA-4 (rs231775), из-за выраженной экспрессии Fas и FasL на поверхности клеток в участках лимфоидной инфильтрации и деструкции тиреоцитов (сильнее у носителей GG-генотипа гена BCL-2 — на 18,54% и 36,18% соответственно), что свидетельствует об инициации внешнего пути апоптоза через каспазный механизм (эффекторную каспазу 8).

Ключевые слова: узловый зоб, аутоиммунный тиреоидит, аденома щитовидной железы, полиморфизмы APO-1/Fas, CTLA-4 и BCL-2 генов.

Association of BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775), APO-1/Fas (rs2234767) gene polymorphisms with activity of proliferation and apoptosis in thyroid tissue of patients with nodular forms of goiter

M.I. Sheremet¹, L.P. Sydorчук¹, V.O. Shidlovskiy²,
A.D. Bedenyuk², H.S. Kurochkin³, A.V. Levitsky³

¹ Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

² I.Ya. Horbachevsky State Medical University, Ternopil, Ukraine

³ N. Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Moldova

Abstract. The purpose was a comparative analysis of apoptosis processes and proliferative activity in the thyroid nodular and pseudonodular tissues of patients with nodular goiter against a background of autoimmune thyroiditis (NGAIT) and thyroid adenoma (TA) and in the morphologically unaltered tissue by studying the expression / density of markers Fas/ FasL, Bcl-2, p53 and Ki-67 on the thyrocytes and with counting the number of immunoreactive cells expressing said markers that regulate apoptosis and proliferation for NGAIT and TA, using the immunohistochemical method, taking into account the polymorphism of the genes BCL-2 (rs17759659), CTLA-4 (rs231775) and APO-1/Fas (rs2234767).

It has been established that in patients with NGAIT and TA, several links of thyrocytes apoptosis mechanism with the advantage of Fas-induced, associated with the genome of BCL-2 (rs17759659) and almost 6 times weaker with the promoter of the CTLA-4 gene (rs231775), are activated due to the expression of Fas and FasL on the surface of the cells of the nodular and pseudonodular tissues of the thyroid gland (more often in the carriers of the GG genotype of the BCL-2 gene — 18.54% and 36.18% respectively), which indicates the initiation of the external pathway of apoptosis through the caspase mechanism (effector caspase 8).

Keywords: nodular goiter, autoimmune thyroiditis, thyroid adenoma, polymorphisms APO-1/Fas, CTLA-4 and BCL-2 genes.