

НАРУШЕНИЕ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ У КРЫС ВИСТАР

В.В. Здор, Е.В. Маркелова, О.М. Олексенко

ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ

Е.В. Маркелова — доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ, врач-иммунолог; В.В. Здор — канд. мед. наук, врач-эндокринолог, ассистент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ; О.М. Олексенко — канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ.

Роль иммунологического регулирования и возможности его контроля с помощью оценки функции регуляторных Т-лимфоцитов актуальны, учитывая распространенность аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в частности болезни Грейвса (БГ). Доступными для практической оценки нарушения толерантности Т- и В-лимфоцитов при БГ являются сывороточные уровни Th1- и Th2-маркерных цитокинов. В созданной модели экспериментального тиреотоксикоза у животных (крысы Вистар) получили достоверное повышение сывороточного уровня ИЛ-1 α , ИФН- γ и ИЛ-10, сопряженное с повышением содержания тиреоидных гормонов, а также достоверное нарушение соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в супернатанте щитовидных желез животных на фоне тиреотоксикоза со смещением в сторону Th1-маркерных цитокинов. Обнаружены также изменения пролиферативной активности тиреоцитов с изменением среднего диаметра фолликулов щитовидной железы.

Ключевые слова: эксперимент, крысы, тиреотоксикоз, цитокины.

Infringement of cytokines regulation and morphological changes of thyroid gland in Wistar rats with experimental thyrotoxicosis

V.V. Zdor, E.V. Markelova, O.M. Oleksenko

Vladivostok State Medical University, chair of pathological physiology; Vladivostok, Russia

In view of abundance of autoimmune diseases of thyroid gland, Graves' Disease in particular, the role of immune regulation and the possibility of controlling it by estimating the function of regulatory T-lymphocytes are important questions today. Available for practical estimation of T- and B- lymphocytes tolerance disorder in GBD are serum levels of Th1- and Th2- marker cytokines. Experimental thyrotoxicosis in Wistar rats showed significant increase in serum Il-1 α , IFN- γ and Il-10 depending on the increase of thyroid hormones, as well as significant changes in correlation between pro- and anti-inflammatory cytokines with the shift towards Th1-marker cytokines in supernatant thyroid glands of the animals with thyrotoxicosis. Are found out also changes of proliferative activity thyrocytes with change of average diameter of follicles of a thyroid gland.

Key words: rats, Graves' disease, thyrotoxicosis, cytokines.

Введение

В течение последних лет сделано несколько важных открытий в изучении основных этапов патогенеза аутоиммунного тиреотоксикоза, получены данные о роли генетически детерминированного на-

рушения иммунологической регуляции и возможности ее контроля с помощью регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) [8–10]. Однако существование различий в свойствах и структуре регуляторных клеток [3, 10] не позволяет специфически применять в кли-

Для корреспонденции: Здор Виктория Владимировна — 690106, Владивосток, ул. Башидзе, 14, кв. 32. Тел. (7914) 791-96-25. E-mail: Lazandoc@mail.ru

нической практике препараты для усиления функциональной или пролиферативной активности Трег. Многочисленные исследования при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы (ЩЖ) продемонстрировали достоверную взаимосвязь между высоким уровнем тиреоидных гормонов и цитокинов [3, 5, 10], которая в основном базировалась на способности цитокинов при их парентеральном введении вызывать соответствующие гормональные реакции, но приоритетная роль цитокинов в патогенезе болезни Грейвса (БГ) окончательно не подтверждена.

Для комплексного мониторинга течения БГ, адекватности проводимого лечения необходимы дополнительные достоверные критерии оценки развития и прогнозирования течения болезни. Такими доступными для применения критериями оценки могут быть секретируемые Трег цитокины, которые, как показано в многочисленных исследованиях, не только являются продуктами функционирования Т-клеток, но и сами образуют самостоятельную систему регуляции гомеостаза [2, 3, 7]. Особый интерес представляют такие аспекты проблемы, как особенности влияния функциональной активности ЩЖ на избыточную продукцию Th1- и Th2-маркерных цитокинов, пролиферативную активность тиреоцитов и возможности оценки взаимодействия иммунной и эндокринной систем при наличии антигенной стимуляции Т-лимфоцитов, в том числе без специфической стимуляции аутоантителами.

Целью работы явилась оценка влияния экзогенного тиреотоксикоза на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и локально в ткани ЩЖ, а также морфологическая верификация этого воздействия.

Материал и методы

Эксперименты были выполнены на 6-месячных белых крысах-самках породы Вистар с массой тела 245 ± 15 г. В первой части эксперимента животные были разделены на 3 группы: у животных 1-й группы ($n = 6$) вызывали экспериментальный гипертиреоз путем введения натошак за 1 ч до утреннего кормления с помощью внутрижелудочного зонда лиотиронина (трийодтиронина) в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела, растворенного в 1 мл физиологического раствора, длительность эксперимента – 30 сут. Животные 2-й группы ($n = 6$) получали аналогичным путем растворенный левотироксин в дозе 50 мкг/кг, также в течение 30 сут. 3-я группа (6 животных) была контрольной. У крыс всех групп, помимо лабораторных показателей, определяли ректальную температуру и массу тела до начала и в конце исследования.

До начала эксперимента животные содержались в условиях вивария Тихоокеанского института био-

органической химии Дальневосточного отделения РАН (Владивосток) в течение 6 мес без каких-либо манипуляций в стандартных условиях обитания и питания. Методы обезболивания животных при взятии крови и декапитации проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 г. № 755 и приложение к приказу Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13.11.84 г. № 742). У всех животных исходно и в конце эксперимента оценивали показатели сывороточного уровня цитокинов: ИЛ-1 α , ИФН- γ и ИЛ-10 (с помощью видоспецифичных диагностических наборов R&D Diagnostics Inc., США) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и определяли показатели сывороточного уровня свободных T_3 , T_4 (fT_3 ; fT_4) методом ИФА (с помощью диагностических наборов фирмы F. Hoffmann – La Roche, Швейцария). Содержание ИЛ-1 α , ИФН- γ , ИЛ-10 определяли также в супернатанте ЩЖ, полученном после декапитации наркотизированных крыс при окончании эксперимента. Были исследованы гистологические препараты ЩЖ крыс контрольной и опытных групп. Отобранный материал (ЩЖ) фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем образцы обезжировали в возрастающей концентрации спирта, впоследствии заливали в парафин-воск. Серийные парафиновые срезы толщиной 6–8 мкм изготавливали на универсальном автоматизированном микротоме НМ-360 фирмы Mikrom (Германия). Изучение общей морфологической картины в световом микроскопе (Olympus CX 31) проводили после окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином, а морфометрию гистологических срезов ЩЖ – по методике Г.Г. Автандилова (1991), определяли средний диаметр фолликулов с использованием программы Image Score v. 10 [1].

Анализ полученных результатов проводили с помощью программы SPSS v.16, выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилке, при получении ненормального распределения оцениваемых показателей применяли U -критерий и другие непараметрические критерии (Мода – M_o , Медиана – Me). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

При осмотре и обследовании животных контрольной группы (3-я группа) выявлено, что их масса тела (247 ± 12 г) и ректальная температура ($37,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$) как исходно, так и по завершении экс-

перимента существенно не изменились. У животных, получавших лиотиронин и левотироксин (1-я и 2-я группы) отмечалось снижение массы тела в динамике в среднем на 15 ± 6 г (6,3% от исходной массы тела) за 30 дней эксперимента. Ректальная температура в группах с гипертиреозом была достоверно выше, чем в контрольной группе, и составила к концу эксперимента $39,1 \pm 0,2^\circ \text{C}$ ($p < 0,05$). Не было выявлено статистически значимых различий ректальной температуры у животных 1-й и 2-й группы.

Уровни циркулирующих fT_3 и fT_4 у крыс контрольной группы находились в следующих пределах: уровень fT_3 составил $5,25 \pm 1,65$ пмоль/л, fT_4 — $15,73 \pm 2,29$ пмоль/л, что достоверно отличалось от показателей в опытных группах животных, принимавших тиреоидные гормоны. В 1-й группе аналогичные показатели были выше (fT_3 $7,25 \pm 1,05$ пмоль/л и fT_4 $52,43 \pm 12,17$ пмоль/л), чем во 2-й группе ($6,90 \pm 1,85$ и $48,13 \pm 11,60$ пмоль/л соответственно), но статистически значимых различий по этим показателям между опытными группами не установлено ($p > 0,05$).

Особый интерес, на наш взгляд, представляют показатели про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИФН- γ и ИЛ-10) в сыворотке крови экспериментальных животных, а также содержание указанных медиаторов в супернатанте ЩЖ крыс, при этом наиболее значимые различия в уровне цитокинов в группах отмечались в сыворотке крови (см. таблицу).

Так, содержание ИЛ-1 α в сыворотке крови животных при экзогенном тиреотоксикозе достоверно превышало аналогичный показатель у здоровых крыс — $26,98 \pm 8,81$ против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл ($p = 0,041$). *U*-критерий (Манна–Уитни) был равен 46. При сравнении показателей в группах, принимавших лиотиронин и левотироксин, выявлены более высокие значения в 1-й группе: $Me^1 = 21,80$ (15,42–38,20) против $Me^2 = 10,09$ (0,80–17,87) пг/мл ($p = 0,009$).

При анализе содержания провоспалительного ИЛ-1 α в супернатанте ЩЖ животных в конце эксперимента получена другая картина: при достоверно более высоком, чем в сыворотке крови, уровне ИЛ-1 α в супернатанте ($37,65 \pm 7,30$ пг/100 мкг белка против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл; $p = 0,041$) группы контроля, в группах с гипертиреозом (1-я и 2-я группы) как в супернатанте, так и в сыворотке крови определялись соизмеримые значения ИЛ-1 α : $29,97 \pm 25$ пг/100 мкг белка и $26,98 \pm 11,75$ пг/мл сыворотки; $p > 0,05$.

При рассмотрении результатов в двух опытных группах более высокие значения цитокина в супернатанте зафиксированы в 1-й группе: $Me^1 = 42,82$ (12,83–52,76) против $Me^2 = 17,31$ (13,38–19,26)

пг/100 мкг. Сравнивая с группой контроля, можно предположить, что продукция ИЛ-1 α осуществляется при экспериментальном тиреотоксикозе в основном экстракореидными лимфоцитами, стимулированными также экстракореидными гормонами (в основном трийодтиронином), вводимыми *per os*.

В результате нашего эксперимента были получены интересные данные о сывороточном уровне ИФН- γ — в группе животных с гипертиреозом он был достоверно выше, чем в группе контроля ($54,56 \pm 11,67$ против $7,41 \pm 0,90$ пг/мл) ($p = 0,009$). При анализе содержания ИФН- γ в супернатанте ЩЖ крыс Вистар достоверных отличий по этому показателю между животными с тиреотоксикозом и контрольной группой не выявлено: $Me^{1,2} = 92,91$ (29,84–133,13) пг/100 мкг белка против $Me^3 = 16,55$ (14,87–163,28) пг/100 мкг ($p > 0,05$). Однако, если при сравнении медиан показателей ИФН- γ здоровых животных в сыворотке и супернатанте было установлено достоверное превышение показателей в супернатанте — $16,55$ (14,87–163,28) пг/100 мкг против $5,96$ (4,41–10,06) пг/мл ($p = 0,009$), то при тиреотоксикозе показатели ИФН- γ были сравнимы — $92,91$ (29,84–133,13) пг/100 мкг и $19,58$ (10,06–68,32) пг/мл ($p > 0,05$).

ИЛ-10 у грызунов в большей степени отвечает за иммуносупрессивную роль при гиперактивности воспалительных реакций и синтезируется активированными Th2-типа [3, 7]. При тиреотоксикозе у животных уровень сывороточного ИЛ-10 был достоверно выше ($19,43 \pm 2,84$ пг/мл), чем в контрольной группе ($p = 0,016$). В 1-й и 2-й группах достоверных различий по уровню ИЛ-10 не выявлено ($p > 0,05$).

В супернатантах ЩЖ существенных отличий в содержании ИЛ-10 между группами не обнаружено, как и при сравнении количества цитокина при тиреотоксикозе в супернатанте и в сыворотке опытных групп: $13,23 \pm 2,31$ пг/мл и $19,43 \pm 2,83$ пг/100 мкг белка ($p > 0,05$). Достоверными были различия в содержании ИЛ-10 (см. таблицу) в супернатанте и сыворотке крови животных группы контроля ($p < 0,01$), что свидетельствует в пользу прямой связи содержания тиреоидных гормонов и цитокинов, в данном случае противовоспалительного ИЛ-10.

При анализе гистологических препаратов в контрольной группе было выявлено, что ЩЖ животных имели средне- и крупновacuольный тип строения, при этом коллоид в большинстве фолликулов был компактный, интенсивно окрашенный, без признаков активной резорбции. При этом средний диаметр фолликулов в группе контроля составил $275,82 \pm 10,91$ мкм, что достоверно отличалось от аналогичного показателя в группах животных с тиреотоксикозом — $346,34 \pm 11,75$ мкм ($p = 0,010$). В 1-й и 2-й

Показатели уровня оппозиционных цитокинов в сыворотке крови и супернатанте ЩЖ крыс Вистар

Показатели		Медиана значений цитокинов в группах (Ме)	
		контрольная группа (n = 6)	группы с тиреотоксикозом (n = 12)
Сыворотка, пг/мл:	ИЛ-10	5,62 (2,68–18,20)	16,59 (11,80–28,08)**
	ИЛ-1 α	1,90 (0,01–8,98)	15,42 (0,80–38,20)*
	ИФН- γ	5,96 (4,41–10,06)	19,58 (10,06–68,32)**
Супер-натант, пг/100 мкг белка:	ИЛ-10	25,07 (1,94–40,52)	8,19 (5,39–20,48)
	ИЛ-1 α	17,31 (16,69–64,24)	19,26 (12,83–42,82)
	ИФН- γ	16,55 (14,87–163,28)	92,91 (29,84–133,13)

Примечание. Статистическая значимость различий между показателями по U-критерию Манна–Уитни: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

группах были обнаружены также и другие морфологические отличия от контрольной группы, а именно: преобладали фолликулы со слабоокрашенным “жидким” коллоидом, с очаговой прикраевой вакуолизацией, в некоторых полях зрения коллоид практически полностью отсутствовал, в просветах фолликулов обнаруживались лишь его хлопьевидные остатки. Пролиферация эпителия наблюдалась преимущественно в виде активного образования микрофолликулов, не содержащих коллоида, сформированных из округлых клеток со светлой цитоплазмой и крупным ядром. Все вышеперечисленные изменения в ЩЖ при тиреотоксикозе не противостоят характерной для тиреотоксикоза гистологической картине [6], за исключением отсутствия увеличения высоты фолликулярных эпителиоцитов, которые были преимущественно низкими призматическими или кубическими. Выявление достоверных отличий размеров фолликулов и пролиферативной активности тиреоцитов при непродолжительном экзогенном тиреотоксикозе указывает на необходимость дальнейшего изучения взаимодействия иммунных клеток, тиреоцитов и их рецепторов при БГ.

Для уточнения высказанных предположений был проверен коэффициент соотношения содержания ИФН- γ / ИЛ-10 в сыворотке крови и супернатанте ЩЖ животных: у здоровых животных данный показатель составил в сыворотке крови 1,1, в супернатанте 0,66; при тиреотоксикозе данные коэффициенты резко изменились (1,2 и 11,35 соответственно) в сторону повышения в супернатанте, что свидетельствует об активации Th1 в ЩЖ у крыс при создании искусственного тиреотоксикоза.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать ряд предварительных выводов:

1. Увеличение уровня сывороточных цитокинов в ответ на повышение содержания тиреоидных гормонов

свидетельствует о вторичных изменениях в иммунитете, которые, вероятно, по закону обратной связи поддерживают имеющиеся изменения в гормональном статусе, влияя на Т-хелперы и стимулируя выработку антител.

2. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в норме у млекопитающих в сыворотке крови и в ЩЖ приближено к 1, с незначительным преобладанием Th2-маркерных цитокинов *in situ*, тогда как при тиреотоксикозе происходит изменение соотношения на органном уровне в сторону Th1-маркерных цитокинов.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990.
2. Кандрор В.И. Механизмы развития болезни Грейвса и действия тиреоидных гормонов. Клинический и экспериментальный тиреологический журнал. 2008; 1: 26–35.
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.: ил., ISBN 5-06-000471-6.
5. Маркелова Е.В., Лазанович В.В. Аутоантитела и цитокиновый профиль у пациентов с болезнью Грейвса–Базедова и их динамика на фоне терапии тиростатиками. Мед. иммунол. 2008; 10 (2–3): 245–250.
6. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: Сотис, 2002.
7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
8. Fehervari Z., Sakaguchi S., Fehervari Z., Sakaguchi S. Cd4+ tregs and immune control. J. Clin. Invest. 2004; 114: 1209–1217.
9. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation. J. Clin. Invest. 2004; 114: 1198–1208.
10. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 2004; 22: 532–562.
11. Weetman A.P. Autoimmune thyroid disease. Autoimmunity. 2004; 37: 337–340.