

В.В. Здор, Е.В. Маркелова

СОСТОЯНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ У КРЫС ВИСТАР*Владивостокский государственный медицинский университет (Владивосток)*

Роль иммунологического регулирования и возможности его контроля с помощью оценки функции регуляторных Т-лимфоцитов актуальны в настоящее время, 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 экзогенного тиреотоксикоза у животных (крысы Wistar) получили достоверное повышение сывороточного уровня ИЛ-1 β , 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.

Ключевые слова: эксперимент, крысы, тиреотоксикоз, цитокины

CYTOKINE PROFILE IN WISTAR RATS WITH EXPERIMENTAL THYREOTOXICOSIS

V.V. Zdor, E.V. Markelova

Vladivostok State Medical University, Vladivostok

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 exogenous thyreotoxicosis in Wistar rats showed significant increase in serum IL-1 β , 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 thyreotoxicosis.

Key words: experiment, rats, thyreotoxicosis, cytokines

Болезнь Грейвса (БГ) — системное органоспецифическое аутоиммунное заболевание, сопровождающееся выработкой аутоантител к рецептору тиреотропного гормона, клинически проявляющееся синдромом тиреотоксикоза в сочетании с экстратиреоидной патологией [1, 4, 5]. В течение последних десятилетий сделано несколько очень важных открытий в изучении основных этапов патогенеза аутоиммунного тиреотоксикоза. В исследованиях представлены данные о роли генетически детерминированного нарушения иммунологического регулирования и возможности его контроля с помощью регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) [7, 10, 11]. Однако, существование различий в свойствах и структуре регуляторных клеток [8, 9] не позволяет специфически применять в клинической практике препараты для усиления функциональной или пролиферативной активности Трег из-за неопределенности в генезе нарушения толерантности у Т- и В-лимфоцитов при гипертиреозе. Для комплексного мониторинга течения БГ, адекватности проводимого лечения необходимы дополнительные достоверные критерии оценки развития и прогнозирования течения болезни.

Таковыми доступными для применения критериями оценки могут быть секретируемые Трег цитокины, которые, как представлено в многочисленных исследованиях, ни только являются продуктами функционирования Т-клеток, но и сами

образуют самостоятельную систему регуляции всего гомеостаза [2, 6]. Особый интерес на наш взгляд представляют такие аспекты проблемы, как особенности влияния функциональной активности щитовидной железы на избыточную продукцию Th1- и Th2-маркерных цитокинов 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 у белых крыс Вистар на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и локально в ткани щитовидной железы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на взрослых (6-месячных) белых крысах-самках породы Вистар с массой тела 245 ± 15 г. В первой части эксперимента животные были разделены на три группы: у животных первой группы (в количестве 6 голов) вызывался экспериментальный гипертиреоз путем введения натошак за час до утреннего кормления с помощью внутрижелудочного зонда гормона щитовидной железы лиотиронина (трийодтиронина) в дозе 50 мкг/кг массы тела, растворенного в 1 мл физиологического раствора, длительность эксперимента — 30 суток. Вторая группа (6 голов)

получала аналогичным путем растворенный левотироксин (тетрайодтиронин) в дозе 50 мкг/кг массы тела также в течение 30 суток. У первой и второй групп, помимо лабораторных показателей, были оценены: ректальная температура и масса тела до начала и в конце исследования. Третья группа (6 голов) была контрольной.

Животные содержались до начала эксперимента в условиях вивария Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН РФ (г. Владивосток) в течение 6 месяцев без каких-либо манипуляций в стандартных условиях обитания и питания. Применяемые 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 12.08.1977 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 оценивались показатели сывороточного уровня цитокинов: ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-10 (видоспецифичные диагностические наборы «R&D Diagnostics Inc.», США) методом твердофазного ИФА и определялись показатели сывороточного уровня свободных Т3, Т4 (fT3; fT4) методом иммуноферментного анализа (с помощью диагностических наборов фирмы «F. Hoffmann-La Roche», Швейцария). Данные цитокины (ИЛ-1 β , ИФН- γ , ИЛ-10) определялись также в супернатанте щитовидной железы, полученном после декапитации наркотизированных крыс при окончании эксперимента. Анализ полученных результатов проводился при помощи программы SPSS v.16, выборки проверялись на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро – Уилка, применяли U-критерий. Критический уровень значимости был 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При осмотре и обследовании животных из контрольной группы (3-я группа) выявлено, что их масса тела (247 ± 12 г) и ректальная температура

($37,8 \pm 0,1$ °C) как исходно, так и по завершению эксперимента существенно не изменились. В отличие от контрольной группы, 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 $39,1 \pm 0,2$ °C ($p < 0,05$). Не было выявлено статистически значимых различий ректальной температуры у животных 1-й и 2-й группы.

Определение уровней циркулирующих fT3 и fT4 у крыс Вистар показал, что в контрольной группе концентрация тиреоидных гормонов находилась в следующих пределах: уровень свободного Т3 составил $5,25 \pm 1,65$ пмоль/л, свободного Т4 – $15,73 \pm 2,29$ пмоль/л, что достоверно отличалось от показателей в опытных группах, принимавших тиреоидные гормоны. В 1-й группе аналогичные показатели были выше (fT3 = $7,25 \pm 1,05$ пмоль/л и fT4 = $52,43 \pm 12,17$ пмоль/л), чем во второй группе – $6,90 \pm 1,85$ пмоль/л и $48,13 \pm 11,60$ пмоль/л соответственно, но статистически достоверной разницы между опытными группами не было установлено ($p > 0,05$).

Особенно интересными, на наш взгляд, были показатели про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-10) в сыворотке крови экспериментальных животных, а также содержание указанных медиаторов в супернатанте щитовидных желез крыс (табл. 1).

Наиболее значимые различия в уровне провоспалительных цитокинов у опытных животных и контрольной группы отмечались в сыворотке крови (табл. 1).

Так, содержание ИЛ-1 β в сыворотке крови животных при экзогенном тиреотоксикозе достоверно превышало показатели здоровых крыс – $26,98 \pm 8,81$ против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл ($p < 0,05$). При расчете – U-критерий (Манна – Уитни) был равен 46. Сравнивая показатели в группах, принимавших лиотиронин и левотироксин:

Таблица 1
Показатели уровня оппозиционных цитокинов в сыворотке крови и супернатанте щитовидных желез крыс Wistar

Показатели, пг/100 мкг белка		Медиана показателей цитокинов у групп (Ме)	
		Контрольная группа, n = 6	Группа с тиреотоксикозом, n = 12
Сыворотка, пг/мл	ИЛ-10	5,62 (2,68–18,20)	16,59 (11,80–28,08)**
	ИЛ-1 β	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)**
Супернатант, пг/100 мкг белка	ИЛ-10	25,07 (1,94–40,52)	8,19 (5,39–20,48)
	ИЛ-1 β	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 ($p < 0,05$ по U- критерию Манна – Уитни). ** – $p < 0,01$ по U-критерию Манна – Уитни.

$Me^1 = 21,80$ ($15,42 - 38,20$) против $Me^2 = 10,09$ ($0,80 - 17,87$) пг/мл, ($p < 0,01$). Сравнивая с группой контроля — $Me^3 = 1,90$ ($0,01 - 8,98$) пг/мл, ($p < 0,05$).

При анализе содержания провоспалительного ИЛ-1 β в супернатанте щитовидных желез животных в конце эксперимента получена другая картина: при достоверно более высоком, чем в сыворотке крови, уровне ИЛ-1 β в супернатанте ($37,65 \pm 7,30$ пг/100 мкг белка против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл; $p < 0,05$) 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 β : $29,97 \pm 5,25$ 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 — $Me^3 = 17,31$ ($16,69 - 64,29$) пг/100 мкг ($p > 0,05$), можно предположить, что продукция ИЛ-1 β осуществляется при экспериментальном тиреотоксикозе в основном экстрагиреодными лимфоцитами, стимулированными также экстрагиреодными гормонами (в основном трийодтиронином), вводимыми *per os*.

В результате нашего эксперимента были получены интересные данные о сывороточном уровне ИФН- γ — он был достоверно более высок в группе животных с гипертиреозом ($54,56 \pm 11,67$ пг/мл против $7,41 \pm 0,90$ пг/мл) по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$). При расчете — U-критерий (Манна — Уитни) был равен 34; $p < 0,01$.

При анализе содержания ИФН- γ в супернатанте щитовидных желез крыс Wistar достоверных отличий между гипертиреодными животными и контрольной группой выявлено не было: $Me^{1'2} = 92,91$ ($29,84 - 133,13$) 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, ($p < 0,01$); 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 ($p > 0,05$).

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) у грызунов в большей степени отвечает за иммуносупрессивную роль при гиперактивности воспалительных реакций и синтезируется активированными Th2 [2, 3, 6]. При тиреотоксикозе у животных отмечалось достоверное превышение уровня сывороточного ИЛ-10 — $19,43 \pm 2,84$ пг/мл в контрольной группе ($p < 0,05$), что подтверждалось проверкой критерия Манна — Уитни ($22,5$; $p < 0,01$). Между показателями в первой и второй группах достоверных различий в уровне ИЛ-10 не выявлено ($p > 0,05$).

В супернатанте щитовидных желез существенных отличий содержания ИЛ-10 выявлено

не было, 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 в группе контроля между супернатантом и сывороткой крови животных ($p < 0,01$), что свидетельствует в пользу прямой связи содержания тиреоидных гормонов и цитокинов, в данном случае противовоспалительного ИЛ-10.

Для уточнения вышесказанных предположений был проверен коэффициент соотношения содержания ИФН- γ / ИЛ-10 в сыворотке крови и супернатанте щитовидных желез 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 щитовидной железе у крыс при создании искусственного тиреотоксикоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 щитовидной железе 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кандрор В.И. Механизмы развития болезни Грейвса и действия тиреоидных гормонов // Клиническая и эксперим. тиреоидология. — 2008. — Т. 1. — С. 26 — 35.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: ООО Изд-во Фолиант, 2008. — 552 с.
3. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. А.В. Караулова. — М.: ООО Мед. информ. агентство, 2002. — 651 с.
4. Маркелова Е.В., Лазанович В.В. Аутоантитела и цитокиновый профиль у пациентов с болезнью Грейвса-Базедова и их динамика на фоне терапии тиронамидами // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2 — 3. — С. 245 — 250.
5. Фадеев В.В. Болезнь Грейвса // Рус. мед. журн. — 2002. — № 27. — С. 1262 — 1265.
6. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
7. Fehervari Z., Sakaguchi S., Fehervari Z., Sakaguchi S. Cd4 + tregs and immune control // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 1209 — 1217.

8. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 1114. — P. 1198–1208;
9. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // Annu. Rev. Immunol. — 2004. — Vol. 22. — P. 532–562.
10. Volpe R. Immunoregulation in Autoimmune Thyroid disease // Thyroid. — 1994. — Vol. 4, N 3. — P. 373–377.
11. Weetman A.P. Autoimmune thyroid disease // Autoimmunity. — 2004. — Vol. 37. — P. 337–340.

Сведения об авторах

Здор Виктория Владимировна – врач-эндокринолог высшей категории, ассистент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития, кандидат медицинских наук (690106, г. Владивосток, ул. Башидзе, 14, кв. 32; тел.: +79147919625; 84232446080)

Маркелова Елена Владимировна – заведующая кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития, врач-иммунолог высшей категории, доктор медицинских наук, профессор (690088, г. Владивосток, ул. Жигура, 40, кв. 57; тел. моб.: +79147078559)