

ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИММУНОЦИТОВ

Здор В.В.¹, Маркелова Е.В.¹, Гельцер Б.И.^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. Исследование патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, занимающих особое место в группе эндокринной патологии из-за высокой распространенности, является одной из актуальных проблем современной медицины. Триггерные механизмы их развития до сих пор неизвестны. Изменения тиреоидного статуса при нетиреоидной патологии, например при развитии «nonthyroidal syndrome», могут запускать синтез оппозитных цитокинов с последующей потерей толерантности к аутоантигенам щитовидной железы. Предполагается, что мастоциты через Toll-like receptors могут влиять на секреторную активность тиреоцитов и тем самым запускать синтез оппозитных цитокинов с последующей потерей ауто толерантности. Мастоциты, зафиксированные в щитовидной железе при ее аутоиммунной патологии, могут молекулярным способом выделения секреторного материала регулировать функциональную активность иммуноцитов и эндокриноцитов. Однако до сих пор точно неизвестно, какой из механизмов активации мастоцитов преобладает при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, первично ли влияние уровня тиреоидных гормонов на данную активацию или изменения в тиреоидном статусе носят вторичный характер. Для выяснения этих вопросов в исследовании изучались особенности функционального состояния мастоцитов и продукции оппозитных цитокинов (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) при экспериментальном тиреотоксикозе и гипотиреозе. Для амплификации иммунного ответа одной из групп экспериментальных животных с тиреотоксикозом вводился рекомбинантный интерлейкин-2.

Специфические изменения соотношения IFN γ /IL-10 в зависимости от тиреоидного статуса свидетельствовали о значении баланса оппозитных цитокинов в развитии разных вариантов данной патологии. Достоверное увеличение Th1-маркерных цитокинов на органном уровне при тиреотоксикозе доказывает непосредственное участие тиреоидных гормонов в иммунорегуляторных процессах, что подтверждается очаговой мастоцитарной инфильтрацией щитовидной железы на фоне достоверного увеличения провоспалительных цитокинов на системном и органном уровнях. Гипотеза о возможной рецепции тиреоидных гормонов клетками иммунной системы доказана наличием интенсивных корреляций между показателями оппозитных цитокинов в органе-мишени и тиреоидными гормонами в периферическом кровотоке. Установлена регуляторная роль интерлейкина-2 в сохранении баланса оппозитных цитокинов и изменении направления вектора иммунного ответа при измененном тиреоидном статусе. На основании проведенного исследования стал более очевидным факт важной роли мастоцитов и баланса оппозитных цитокинов в патогенезе тиреоидной дисфункции. Требуются дальнейшие исследования, проясняющие механизмы взаимодействия тиреоидных гормонов и иммуноцитов.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны, аутоантитела, оппозитные цитокины, мастоциты

THYROID STATUS AND ITS CORRELATION WITH THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNOCYTES

Zdor V.V.¹, Markelova E.V.^a, Geltser B.I.^{a, b}

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Pathogenesis studies in thyroid autoimmune diseases take a specific place among endocrine disorders, due to high prevalence of these pathologies, thus representing an urgent problem of the modern medicine. Their triggering mechanisms of their are still unknown. Changes of thyroid status in cases of non-thyroid pathology, e.g., during development of «nonthyroidal syndrome», may launch synthesis of some functionally opposite cytokines by immunocytes, with subsequent loss of tolerance to thyroid autoantigens. One

Адрес для переписки:

Здор Виктория Владимировна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 4.
Тел.: 8 (914) 791-96-25.
E-mail: victoria.zdor@mail.ru

Address for correspondence:

Zdor Victoria V.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave, 4.
Phone: 7 (914) 791-96-25.
E-mail: victoria.zdor@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Здор, Е.В. Маркелова, Б.И. Гельцер «Тиреоидный статус и его взаимосвязь с функциональной активностью иммуноцитов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 293–300. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300
© Здор В.В. и соавт., 2017

For citation:

V.V. Zdor, E.V. Markelova, B.I. Geltser «Thyroid status and its correlation with the functional activity of immunocytes», *Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 293–300. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300

may suggest that mast cells may potentially influence secretory activity of thyrocytes via Toll-like receptors, and, therefore, induce synthesis of opposite cytokines, with subsequent loss of auto-tolerance. The mast cells found in thyroid gland affected by an autoimmune disorder may also regulate functional activity of immunocytes and hormone-secreting cells due to molecular effects of secretable substances. The mechanisms prevailing in autoimmune thyroid disease are, however, widely unknown. These effects may involve either primary activation of mast cells by thyroid hormones, or secondary changes of thyroid status. To address these issues, we studied some features of mast cells response and production of functionally opposite cytokines (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) in experimental thyrotoxicosis and hypothyroidism. To boost the immune response, a subgroup of experimental animals with thyrotoxicosis was treated with recombinant interleukin-2. Specific changes of IFN γ /IL-10 ratio depending on thyroid status confirmed a role of opposite cytokine balance for development of different pathological variants. A significant increase in the Th1-marker cytokines revealed at the organ level in cases of thyrotoxicosis argued for direct involvement of thyroid hormones into the immune regulation, as confirmed by a focal infiltration of a thyroid gland with mast cells, along with significant increase in pro-inflammatory cytokines at systemic and organ levels. A hypothesis on possible reception of thyroid hormones by immune cells is in accordance with intensive correlations between the levels of opposite cytokines in target organ and contents of thyroid hormones in peripheral blood. A regulatory role of interleukin-2 was suggested as a factor of keeping balance for opposite cytokines and changing vector of immune response in case of altered thyroid status. The results of our study presume an important role of mast cells and balance of opposite cytokines in pathogenesis of thyroid dysfunction. Further studies are required, in order to clarify the mechanisms of interaction between thyroid hormones and immune cells.

Keywords: thyroid hormones, autoantibodies, opposite's cytokines, mast cell

Введение

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы (АИЗЩЖ) занимают лидирующее место в эндокринной патологии, а распространенность их составляет 5 % от численности всего населения планеты [7]. Именно поэтому сохраняется особое внимание к исследованию патогенеза данной группы заболеваний. Помимо поиска доказательств участия цитокинов и хемокинов в патогенезе АИЗЩЖ, внимание исследователей в последние годы привлекают клетки врожденного иммунитета, в том числе мастоциты (МС) [11, 16]. Они образуют специфическое микроокружение для тиреоцитов наряду с симпатическими нервными волокнами, макрофагами и фибробластами [3, 18]. Известно участие МС в регуляции физиологических и патологических реакций Т-клеток при изменении функции фолликулярного эпителия щитовидной железы (ЩЖ) [21]. МС влияют на активацию Т-клеток, опосредуя эту функцию секрецией ряда оппозитных цитокинов. Однако остаются неясными механизмы, посредством которых МС могут стимулировать Т-клетки. Возможно, это происходит через презентацию аутоантигена, но экспрессия МНС (*Major histocompatibility complex*) II класса МС до настоящего времени оспаривается [22]. Предполагается также, что при развитии "nonthyroidal syndrome" МС могут через TLR (*Toll-like receptors*) влиять на секреторную активность тиреоцитов и тем самым запускать синтез оппозитных цитокинов с последующей потерей толерантности к аутоантигенам ЩЖ. Вместе с тем накопленные факты о важной роли МС в патогенезе АИЗЩЖ требуют дальнейшего прояснения.

Целью исследования явилось изучение особенностей реагирования МС и продукции оппозитных цитокинов (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) при изменениях тиреоидного статуса.

Материалы и методы

Эксперимент одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России (протокол № 3/13, 2013 г.) и выполнен по методике создания экспериментального тиреотоксикоза и гипотиреоза [1] на 6-месячных здоровых крысах-самках Wistar с исходной массой тела 245 \pm 15 г, которые были разделены на четыре группы. В I-й группе (10 голов) моделировали экспериментальный тиреотоксикоз путем введения натошак за час до утреннего кормления с помощью внутрижелудочного зонда натриевой соли левовращающего изомера гормона тироксина ЩЖ (левотироксин натрия в дозе 50 мкг/кг массы тела), растворенного в 1 мл физиологического раствора. II-ая группа (10 голов) получала аналогичным путем левотироксин натрия в той же дозе. С 16 дня эксперимента животным II-й группы дополнительно вводили подкожно рекомбинантный ветеринарный IL-2 («Ронколейкин»), по схеме — 0,1 мл (5000 МЕ) с интервалом 72 часа (всего 5 инъекций в течение 15 дней) с целью моделирования эффектов этого цитокина в условиях тиреотоксикоза. В III-й группе (10 голов) экспериментальный гипотиреоз воспроизводили путем ежедневного введения *per os* растворенного мерказолила (тиамазола) в дозе 10 мг/кг массы тела. IV группа была контрольной (здоровые крысы, 10 голов), находившихся в тех же условиях. Длительность эксперимента для всех групп составила 35 суток. Крысы Wistar были выращены и содержались в аккредитованном vivarium ДВО РАН, где все процедуры с животными проводились в соответствии с международными протоколами экспериментальных работ. В сыворотке крови животных определяли уровень тиреоидных гормонов (ТГ), аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (а/т ТТГр) и оппозитных цитокинов (IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-10). Последние определяли также в супернатантах ЩЖ крыс

во всех группах. Для исследования цитокинов использовали видоспецифичные крысиные диагностические наборы R&D Diagnostics Inc., США. Методом твердофазного ИФА определялись показатели сывороточного уровня свободных ТЗ и Т4 (св. ТЗ; св. Т4). Определение содержания а/т ТТГр проводили с использованием тиреоидных стимулирующих моноклональных антител (электролюминисцентный иммунотест ECLIA фирмы Roche diagnostics, Швейцария). Исследовали также морфологические изменения ЩЖ у крыс с различными вариантами тиреоидного статуса. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином/эозином, толуидиновым синим (0,1 % раствор при pH 4,9) и азотнокислым серебром (AgNO₃). Материал для трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали 2% глutarовым альдегидом, приготовленным на 0,1 М каодилатном буфере (КБ), pH 7,2 в течение суток при 4 °С, затем промывали в трех порциях КБ и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации, помещали в ацетон и заливали в смесь эпоксидных смол — Epon и Araldit (Sigma, USA). Срезы материала изготавливали на микротоме Leica EM UC6 (Leica Mikrosystems, Germany). Полутонкие срезы докрашивали 1% раствором метиленового синего, ультратонкие срезы контрастировали 0,5% водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (1963). Весь гистологический материал анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Germany). Ультратонкие срезы исследовали на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Germany). 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. При подсчете дегранулирующих МС использовали программу ImageJ и формулу индекса дегрануляции (ИД) = Количество дегранулирующих МС / (неизмененные МС + дегранулирующие МС) × n [2].

Результаты

У животных с экспериментальным тиреотоксикозом и гипотиреозом статистически достоверные отличия уровня а/т к ТТГр от здоровых животных были зафиксированы только в I группе (табл. 1). Наибольшие значения медианы (Me) аутоантител отмечались в группе с гипотиреозом, а наибольшая концентрация ТГ в сыворотке крови животных была во II группе.

Прием животными ТГ *per os* повышал у них сывороточный уровень ряда оппозитных цитокинов — IL-1β, IFNγ, IL-10, а блокада синтеза ТГ с помощью тиамазола и создание гипотиреоидного состояния привели к увеличению концентрации IFNγ и TNFα (табл. 2). Был выявлен достоверный рост уровня IL-1β в сыворотке крови во всех группах по сравнению с контролем. Так, Me концентрации цитокина в I группе была мак-

симальной и превосходила показатели здоровых животных в 8 раз, в III группе — в 3 раза, во II-й группе — в 3,9 раза. Высокие показатели сывороточного IFNγ были определены у животных во всех экспериментальных группах.

Показатели IFNγ коррелировали с сывороточным уровнем а/т к ТТГр ($r = 0,68$; $p < 0,01$) и IL-10 в I группе ($r = 0,55$; $p < 0,01$), а после стимуляции IL-2 во II группе связь цитокинов становилась сильной ($r = 0,83$; $p < 0,01$). Между сывороточными уровнями IFNγ и IL-1β в группах тиреотоксикоза были зафиксированы обратные умеренные связи ($r = -0,50$; $p < 0,05$), которые после введения рекомбинантного IL-2 во II группе значительно усиливались ($r = -0,68$; $p < 0,01$). Аналогичные связи имели место между показателями IFNγ и а/т к ТТГр в III группе ($r = -0,67$; $p < 0,05$).

При тиреотоксикозе в I-й и во II-й группах, отмечено резкое увеличение концентрации сывороточного IL-10 по сравнению с контролем и группой гипотиреоза. Между содержанием св. ТЗ и IL-10 выявлена прямая зависимость ($r = 0,52$; $p < 0,05$). Выявлена также сильная прямая связь между уровнем IL-10 и а/т к ТТГр в группе тиреотоксикоза ($r = 0,78$; $p < 0,001$), которая ослабевала после введения IL-2 ($r = 0,63$; $p < 0,05$). В группе гипотиреоза связь между уровнем а/т к ТТГр и IL-10 была средней силы ($r = 0,55$; $p < 0,001$).

Уровень сывороточного TNFα значительно превышал показатели здоровых крыс только в группе с гипотиреозом (табл. 2), а между концентрацией TNFα и уровнем ТГ (св. Т4) выявлена обратная средняя зависимость ($r = -0,57$; $p < 0,001$). В I группе установлена сильная обратная связь ($r = -0,84$; $p < 0,01$) между уровнем а/т ТТГр и показателями TNFα в сыворотке крови. Аналогичная связь, но средней силы имела место между этими показателями в группе гипотиреоза ($r = -0,67$; $p < 0,05$).

Нами зафиксировано достоверное изменение соотношения Th1/Th2-маркерных цитокинов (IFNγ/IL-10) в сыворотке крови экспериментальных животных до 1,2 в группе тиреотоксикоза, 1,9 — в группе с гипотиреозом и 0,77 — в группе тиреотоксикоза на фоне применения рекомбинантного IL-2 против 1,06 — в контроле.

Достоверное снижение органоного уровня IL-10 было установлено в I группе — более чем в 3 раза по сравнению с контролем (табл. 2). В этой же группе отмечалось 5-кратное возрастание уровня IFNγ в супернатантах ЩЖ, и фиксировался значительный дисбаланс оппозитных цитокинов IFNγ/IL-10 в ЩЖ (11,35 против 0,66 в группе контроля; $p < 0,01$). Стимуляция крыс с тиреотоксикозом рекомбинантным IL-2 приводила к незначительному выравниванию нарушенного соотношения IFNγ/IL-10 (до 5,5 против 11,35 в I-й группе; $p < 0,05$) за счет повышения уровня противовоспалительного IL-10, который возрастал практически до нормальных величин. При этом показатели IFNγ сохранялись значительно повышенными. Наиболее заметные отличия в концентрации оппозитных цитокинов

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И АНТИТЕЛ К ТТГ_р В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС
TABLE 1. THYROID HORMONE INDICES AND AUTOANTIBODIES TO TSH_r IN RAT SERUM

Показатель Index	Значения тиреоидных гормонов и аутоантител в группах (Ме, Q _{0,25} -Q _{0,75}) Contents of thyroid hormones and autoantibodies in the subgroups (Me, Q _{0,25} -Q _{0,75})			
	Контрольная группа Control group (n = 10)	Группа с гипотиреозом Group with a hypothyroidism (n = 10)	Группы с тиреотоксикозом Group with a thyrotoxicosis (n = 10)	Группа с тиреотоксикозом на фоне ИЛ-2 Group with thyrotoxicosis and IL-2 treatment (n = 10)
св. Т3, пмоль/л Free T3, pmol/L	5,25 (3,60-6,90)	1,98* (1,24-2,09)	8,27* (7,05-9,34)	10,59** (8,24-11,30)
св. Т4, пмоль/л Free T4, pmol/L	15,73 (13,44-18,02)	8,04* (6,21-9,16)	52,43* (39,73-64,60)	62,70* (42,70-68,24)
а/т к ТТГ _р , МЕ/л Auto-antibodies to TSH _r IU/L	2,11 (2,26-3,31)	4,31 (3,21-6,10)	4,27* (3,33-7,12)	3,52 (2,80-3,71)

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных животных и контролем ($p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $p < 0,01$ по U-критерию.

Note. *, the differences between experimental animals and controls are significant by $p < 0,05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, by $p < 0,01$.

в супернатантах ЩЖ были зафиксированы у животных с экспериментальным гипотиреозом. При этом уровни ИЛ-1 β , IFN γ и TNF α в ЩЖ животных III группы отличались от группы контроля в десятки раз, а уровень ИЛ-10 превышал аналогичные показатели в ЩЖ здоровых крыс в 4 раза. Кроме того, зафиксированы отличия от групп животных с тиреотоксикозом: содержание ИЛ-1 β в ЩЖ крыс с гипотиреозом превышало аналогичный показатель при тиреотоксикозе в 55 раз, TNF α – в 10 раз, ИЛ-10 в 5 – 13 раз. Содержание IFN γ при гипотиреозе было максимальным, а Ме маркера превышала аналогичный показатель контроля в 9 раз.

Во II и III группах уровень ИЛ-1 β в сыворотке крови был повышен, но, как и в контроле, был значительно ниже, чем в супернатантах ЩЖ (табл. 2). В I-й группе показатели ИЛ-1 β в сыворотке и супернатантах были сравнимыми, а соотношение оппозитных цитокинов ИЛ-10/ИЛ-1 β в супернатантах ЩЖ было нарушено: до 0,43 – в I-й группе и 0,96 – во II группе против величины в 1,45 в контроле. При гипотиреозе это значение снижалось до 0,21. Соотношение оппозитных цитокинов (IFN γ /ИЛ-10) в сыворотке крови в контроле и при тиреотоксикозе было близким к 1, но *in situ* у здоровых животных незначительно преобладали Th2-маркерные цитокины. При тиреотоксикозе это соотношение резко (в 17 раз) повышалось на органном уровне и изменялось в сторону Th1-маркерных цитокинов. Рекомбинантный ИЛ-2 существенно корректировал этот дисбаланс *in situ*, но значительно изменял соотношение оппозитных цитокинов в периферической крови в сторону Th2-маркерных цитокинов. Выявлены также корреляции между уровнем св.Т3 и оппозитными цитокинами в супернатантах ЩЖ. Так, в III группе были зафиксированы сильные обратные связи между св.Т3 и TNF α ($r = -0,981$; $p < 0,01$), между св.Т3 и IFN γ

($r = -0,980$; $p < 0,01$); св.Т3 и ИЛ-1 β ($r = -0,892$; $p < 0,01$); св.Т3 и ИЛ-10 ($r = -0,842$; $p < 0,01$).

При гистологическом исследовании ЩЖ животных с экспериментальным тиреотоксикозом в нескольких случаях зафиксирована мелкоочаговая лимфоидная инфильтрация паренхимы ЩЖ. Прлиферация эпителия наблюдалась преимущественно в виде активного образования микрофолликулов, не содержащих коллоида, сформированных из округлых клеток со светлой цитоплазмой и крупным ядром. У животных, получавших рекомбинантный ИЛ-2, имелись признаки пролиферации эпителия в виде «подушек Сандерсона» (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Кроме того, в некоторых случаях была выявлена очаговая лимфоидная инфильтрация ЩЖ, без формирования лимфоидных фолликулов и светлых центров.

При экспериментальном гипотиреозе в ЩЖ крыс фиксировалась очаговая пролиферация тиреоидного эпителия, в том числе в виде «подушек Сандерсона», множественные диссоциированные мастоциты (МС), расположенные интерфолликулярно и интрастромально. В подавляющем большинстве ядер клеток фолликулярного эпителия не обнаружено увеличение NOR-областей, что не указывает на усиление пролиферативных свойств А-клеток ЩЖ. Вместе с тем исследование тканей регионарных лимфатических узлов выявило очаги лимфогистиоцитарной пролиферации. При гистологическом исследовании также была установлена очаговая мастоцитарная инфильтрация стромы ЩЖ и окружающей жировой клетчатки с признаками парциальной дегрануляции МС в I-й группе (рис. 3, см. 2-ю стр. обложки). Дегрануляция МС достоверно изменялась после стимуляции ИЛ-2 во II-й группе и была также зафиксирована в III-й экспериментальной группе (табл. 3; рис. 1, 2 – см. 2-ю стр. обложки). ИД рассматривается как важный критерий функциональной активности МС.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ ЩЖ КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ И ГИПОТИРЕОЗЕ

TABLE 2. COMPARATIVE DATA ON CYTOKINE LEVELS IN BLOOD SERUM AND THYROID SUPERNATES IN RAT EXPERIMENTS WITH THYROTOXICOSIS AND A HYPOTHYROIDISM

Показатели Indices		Контрольная группа Control group (n = 10)	Значения цитокинов в группах (Me, Q ₂₅ -Q ₇₅) Cytokine values in groups (Me, Q ₂₅ -Q ₇₅)		
			Группа I (тиреотоксикоз) Group with thyrotoxicosis (n = 10)	Группа II (тиреотоксикоз и IL-2) Group with thyrotoxicosis and IL-2 (n = 10)	Группа III (гипотиреоз) Group with hypothyroidism (n = 10)
Сыворотка крови, пг/мл Blood serum, pg/ml	IL-10	5,62 (2,68-9,24)	16,59 (11,80-28,08)*	34,23 (28,41- 45,19)**	8,40 (2,70-27,20)
	IL-1β	1,90 (0,02-1,98)	15,42 (5,80-38,20)*	3,90 (2,35-42,24)*	4,76 (4,10-4,09)*
	TNFα	0,28 (0,26-1,52)	0,32 (0,28-16,6)	0,29 (0,28-0,85)	13,72 (11,1-36,93)**
	IFNγ	5,96 (4,41-10,06)	19,58 (10,26-68,32)**	26,41 (10,14-47,15)*	16,30 (13,91-23,88)*
Супер- натант, пг/100 мкг белка Supernate, pg/100 mcg protein	IL-10	25,07 (1,94-40,52)	8,19# (5,39-20,48)	20,48# (2,74-35,61)	110,18 (82,39- 165,23)***
	IL-1β	17,31 (16,69-64,24)	19,26# (12,83-42,82)	21,36# (6,21-41,45)	516,08 (450,37- 748,69)***
	TNFα	44,91 (6,10-58,09)	42,58# (11,98-126,45)	50,17# (22,56-121,72)	478,68 (430,63- 591,48)***
	IFNγ	16,40 (14,87-69,21)	92,91# (29,84-133,13)	112,89# (12,51-151,29)	154,92 (106,44- 591,48)*

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных и контрольной групп ($p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $p < 0,01$ по U-критерию Манна–Уитни; # – статистическая значимость различий между группами с гипотиреозом и тиреотоксикозом $p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни.

Note. *, the differences between experimental and control groups are significant by $p < 0.05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, $p < 0.01$, by Mann–Whitney criterion. #, statistical significance of distinctions between indices of the experimental animals with hypothyroidism and thyrotoxicosis ($p < 0.05$ by Mann–Whitney criterion).

Если в I-й группе дегранулирующие МС были зафиксированы в строме и перифолликулярном пространстве (рис. 3, 4 – см. 2-ю стр. обложки), то после применения IL-2 их количество достоверно увеличилось в пери- и межфолликулярном пространстве ЩЖ. Об активности тканевых МС во II-й группе свидетельствуют зафиксированные различные варианты дегрануляции – частичный (парциальный) и стандартный, а также диссеминация гранул за пределы цитоплазмы клеток. В III-й группе количество МС и ИД были выше, чем в группе контроля и во II-й группе, но ниже, чем в I-й группе. В группе гипотиреоза фокусы инфильтрации ЩЖ МС преобладали в капсулярной зоне, периваскулярно и интерфолликулярно (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). В капсулярной и периваскулярной зонах изменялась форма МС на полигональную и овальную, а интерфолликулярные МС были в основном лентовидные и веретеновидные. Количество дегранулирующих МС в паренхиме ЩЖ III-й группы было выше, чем в субкапсулярной и периваскулярной зонах. Единичные интерфолликулярные МС тесно прилежали к клеткам фолликулярного эпителия и дегранулировали среди пролиферирующих тиреоцитов (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). Важно

отметить, что ИД во II группе был выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$), но ниже, чем в группе с тиреотоксикозом без дополнительного введения IL-2 ($p_{I-II} < 0,05$) и в группе гипотиреоза ($p_{II-III} < 0,05$), где ИД был максимальным.

Обсуждение

Наиболее высокие уровни св.Т3 и св. Т4 во II группе свидетельствуют о стимулирующем действии IL-2 на синтез ТГ и согласуются с данными об IL-2-подобном действии ТТГ [4]. Достоверно возросший уровень оппозитных цитокинов убедительно доказывает влияние ТГ на функцию иммуноцитов и их участие в иммунорегуляторных процессах. Результаты изменения концентрации IL-1β у животных в зависимости от уровня ТГ позволяют обсуждать его роль в механизмах реагирования на изменения тиреоидного статуса [20]. Кроме того, между сывороточным уровнем IL-1β и IL-10 в I-й группе были выявлены сильные обратные связи ($r = -0,75$; $p < 0,001$), которые изменялись на противоположные – прямые средней силы после дополнительной стимуляции IL-2 животных II группы ($r = 0,69$; $p < 0,001$). Как известно, IL-2 контролирует Th1-/Th2-баланс

и связан с формированием пула Трег-клеток, их активацией, поддержанием их количества и обратной связи между Трег и Т-эффекторными клетками [13]. Подобная динамика корреляций может указывать на то, что, помимо регуляторного действия ТГ и IL-2 на иммунциты, имеют место модулирующие эффекты IL-2 на функцию других цитокинов.

Учитывая, что в экспериментальных моделях были применены препараты, приводящие к разнонаправленным изменениям тиреоидного статуса, можно утверждать, что реакция иммунцитов на любые изменения уровня ТГ проявлялась повышением синтеза IFN γ и являлась неспецифической. Такой тип реагирования позволяет предположить наличие иммунцитов-посредников, например клеток врожденного иммунитета с неспецифическими реакциями, с последующим производством IFN γ непосредственно клетками-мишенями (тиреоцитами), что было подтверждено в наших исследованиях высокими показателями данного цитокина в супернатантах ЩЖ животных. IFN γ , как известно, может усиливать экспрессию МНС-II класса на поверхности АПК, в том числе тиреоцитов и МС, стимулировать процессинг антигенов путем индукции иммунопротеасом, что улучшает презентацию антигена и запускает механизмы адаптивного иммунного ответа [6]. Эти фундаментальные данные согласуются с полученными прямыми средней силы связями между сывороточным уровнем а/т к ТТГр и IFN γ у крыс с тиреотоксикозом и обратными связями между этими показателями при гипотиреозе, что демонстрирует определяющее значение концентрации ТГ. Полученные в исследовании прямые средней силы связи между уровнем а/т к ТТГр и IL-10 согласуются с данными других авторов о регуляторной функции цитокина непосредственно в ЩЖ [12]. Значительно повышенный уровень сывороточного TNF α при гипотиреозе позволяет отнести данный провоспалительный цитокин к его специфическим маркерам, а также рассматривать TNF α как воз-

можный триггерный фактор аутоиммунного воспаления в ЩЖ. За счет стимуляции синтеза CXCL10 тиреоцитами [6], TNF α может вызывать амплификацию иммунного ответа и инициировать аутоиммунный тиреоидит [7]. В результате эксперимента было также доказано, что достаточно кратковременное изменение уровня ТГ сопровождается дисбалансом в концентрации основных предикторов амплификации иммунного ответа. Зафиксированная динамика может свидетельствовать о ключевой роли ТГ в сохранении баланса Th1-/Th2- и Трег-цитокинов, т. к. сдвиг уровня сывороточных оппозитных цитокинов был ответом на изменение тиреоидного статуса, что не противоречит результатам предшествующих исследований [14].

Сравнение соотношений оппозитных цитокинов в сыровотке крови животных и супернатантах ЩЖ позволяет предположить, что высокая концентрация IFN γ связана с его «перепроизводством» в ЩЖ, а гиперпродукция IL-10 обусловлена в основном его избыточным синтезом иммунцитами в системном кровотоке. Это подтверждается тем фактом, что во всех экспериментальных группах уровень IFN γ был умеренно повышен в сыровотке крови и значительно более высоким был его органный уровень. В то же время концентрация IL-10 была достоверно повышена преимущественно в системном кровотоке, за исключением показателей цитокина в супернатантах ЩЖ при гипотиреозе, но в данном случае маркер имел обратные корреляции с уровнем аутоантител. Изменение соотношения IL-10/IL-1 β в системном кровотоке и в ЩЖ, его коррекция с помощью рекомбинантного IL-2 подтверждает гипотезу о важной иммунорегуляторной роли IL-2 и его значения в патогенезе АИЗЩЖ. Сравнительные данные системного и органного уровней IL-1 β не противоречат исследованиям последних лет [20] и расширяют представления о механизмах взаимодействия иммунцитов и ТГ, а сильные корреляции между уровнями ТГ и цитокинов в периферическом кровотоке и в супернатантах

ТАБЛИЦА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МС В ЩЖ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
TABLE 3. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MAST CELLS IN THYROID GLANDS FROM EXPERIMENTAL ANIMALS

Группы животных Groups of animals	Морфофункциональные показатели ЩЖ Morphological characteristics of thyroid glands	
	Количество МС в 1 мм ² Numbers of mast cells per 1 mm ²	Индекс дегрануляции МС Degranulation index of mast cells
Контроль Controls (n = 10)	2,75±0,31	0,31±0,02
I группа I group (n = 10)	12,56±1,20**	0,56±0,03*
II группа II group (n = 10)	5,75±0,21*	0,39±0,011*
III группа III group (n = 10)	7,32±0,27*	0,597±0,02*

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных животных и контролем ($p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $p < 0,01$ по U-критерию.

Note. *, the differences between experimental animals and controls are significant by $p < 0,05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, by $p < 0,01$.

ЩЖ убедительно доказывают суперантигенные и регуляторные свойства ТГ.

Выявленные при гистологическом исследовании ЩЖ животных тесные контакты МС с фолликулярным эпителием и клетками стромы в фокусах микрофолликулярной пролиферации тиреоцитов приводили, вероятно, к молекулярному выделению секреторного материала МС [5], который реализуется без нарушения целостности плазма-леммы и выброса гранул секрета. Очаговая мастоцитарная инфильтрация стромы ЩЖ и окружающей жировой клетчатки с признаками парциальной дегрануляции МС может свидетельствовать об активизации и важной роли МС в иммунопатогенезе АИЗЩЖ. Роль МС в развитии воспаления в органах-мишенях при аутоиммунных эндокринопатиях подтверждена в недавних исследованиях у пациентов с диабетической нефропатией [23]. Однако до настоящего времени точно неизвестен механизм активации МС и их роль при АИЗЩЖ [11, 16]. Предполагают, что идентификация уровня ТГ мастоцитами может происходить как опосредованно — с помощью лимфоцитов и других иммунцитов [20], так и самостоятельно — с помощью наличия рецепторов к ТГ [22]. Это может подтвердить динамика соотношения оппозитных цитокинов в системном кровотоке и супернатантах ЩЖ, а также гистологические изменения, в том числе на фоне дополнительной стимуляции рекомбинантным IL-2, который в отличие от ТГ поступал не через кишечник, а вводился животным парентерально [19]. Более того, исследование ткани регионарных лимфатических узлов выявило очаги лимфогистиоцитарной пролиферации, но при тиреотоксикозе в ткани лимфатических узлов четких признаков фолликулярной гиперплазии с реактивными центрами обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии стимуляции В-клеточной популяции лимфоцитов, но не исключает активизацию Т-клеточной их популяции [3].

Практически трехкратное возрастание сывороточного уровня IL-10 на введение в организм здорового животного ТГ с дальнейшим увеличением сывороточной концентрации цитокина еще в 2 раза после дополнительной стимуляции рекомбинантным IL-2 согласуется с полученными данными гистохимического исследования ЩЖ — качественному изменению дегрануляции МС. Эти данные подтверждают не только важную регуляторную роль IL-2 при тиреотоксикозе, но и его тесную взаимосвязь с функциональной активностью МС (рис. 3, 4 — см. 2-ю стр. обложки). В ряде исследований [16, 17] обсуждается возможная позитивная роль МС в восстановлении функции ЩЖ с гипотиреозом в эутиреоидное состояние после бактериального NTI («не тиреоидной болезни»). Клетки системы иммунитета, в том числе МС [10], содержат ТЗ (трийодтиронин), синтез которого регулируется у них ТТГ, что предполагает непосредственное участие иммунцитов в регулировании тиреоидного статуса.

Наше предположение о важной иммунорегуляторной роли МС при АИЗЩЖ основано на том, что их реакция имела прямую связь с изменением концентрации ТГ у животных с последующим нарастанием системного и органного уровней оппозитных цитокинов, изменением соотношения Th1/Th2-маркерных цитокинов как в сыровотке крови, так и в супернатантах ЩЖ. При тиреотоксикозе значительный дисбаланс содержания IFN γ /IL-10 в ЩЖ выравнивался на фоне введения рекомбинантного IL-2, но при этом изменялся характер дегрануляции МС. Возможно, что МС выполняли в данном случае защитную функцию, так как известно, что эти клетки противодействуют Treg в их дифференцировке в Th17 типа и тем самым способствуют супрессии аутоиммунного воспаления [15]. Один из механизмов, с помощью которого МС влияют на функцию Т-клеток, опосредован секрецией оппозитных цитокинов [8, 9], что может с большой долей вероятности объяснить увеличившийся в 5-6 раз уровень IFN γ в супернатантах ЩЖ животных с тиреотоксикозом (I-я и II-я группы) на фоне мастоцитарной инфильтрации ЩЖ и активной дегрануляции МС.

Заключение

Специфичность изменения соотношения IFN γ /IL-10 в зависимости от тиреоидного статуса может свидетельствовать о значении баланса Th1/Th2-маркерных цитокинов в развитии разных вариантов АИЗЩЖ. Десятикратное увеличение соотношения в сторону Th1-маркерных цитокинов на органном уровне при тиреотоксикозе доказывает непосредственное участие ТГ в иммунорегуляторных процессах путем влияния на этот баланс. Учитывая, что введение ТГ приводило к очаговой мастоцитарной инфильтрации ЩЖ на фоне достоверного увеличения провоспалительных цитокинов на системном и органном уровнях, подтверждает участие ТГ в инициации системного воспалительного ответа, возможно, с помощью рецепции их уровня МС и ответного синтеза МС ряда оппозитных цитокинов. Гипотеза о возможной рецепции ТГ клетками иммунной системы доказана наличием интенсивных корреляций между показателями оппозитных цитокинов в ЩЖ и ТГ в периферическом кровотоке. Установлена важная регуляторная роль IL-2 в сохранении баланса оппозитных цитокинов и направлении вектора иммунного ответа при изменениях тиреоидного статуса.

Благодарности

Тихонову Якову Николаевичу (кафедра патологической анатомии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ) и Елисейкиной Марине Геннадьевне (ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН).

Список литературы / References

1. Здор В.В., Тихонов Я.Н. Иммунные и гистологические изменения в железах внутренней секреции при экспериментальном тиреотоксикозе и гипотиреозе // Клиническая и экспериментальная тиреоидология, 2014. Т. 10, № 1. С. 55-60. [Zdor V.V., Tikhonov Ya.N. Immune and histological changes in the endocrines glands in experimental thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya = Clinical and Exeperimental Thyroidology*, 2014, Vol. 10, no. 1, pp. 55-60. (In Russ.)]
2. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. М.: Медицина, 1996. 554 с. [Microscopic technique: Manual (Ed. by D.S. Sarkisov, Yu.L. Perova)]. Moscow: Medicine, 1996. 554 p.
3. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: СО-ТИС, 2002. 288 с. [Khmel'nitskiy O.K. Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases]. St. Petersburg: SOTIS, 2002. 288 p.
4. Яглова Н.В., Березов Т.Т. Роль тиреотропного гормона в изменении гормонального и цитокинового профиля при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний // Иммунология, 2010. № 3. С. 146-151. [Yaglova N.V., Berezov T.T. The role of thyroid-stimulating hormone in the changing hormonal and cytokine profile in experimental syndrome nonthyroidal diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 3, pp. 146-151. (In Russ.)]
5. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 155, № 2. С. 260-263. [Yaglova N.V., Yaglov V.V. Ultrastructural characteristics of molecular release of secretory products from thyroid mast cells induced by lipopolysaccharide. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 155, no. 2, pp. 260-263. (In Russ.)]
6. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
7. Antonelli A., Ferrari S.M., Corrado A., Di Domenicantonio A., Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 174-180.
8. Benoist C., Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 2002, Vol. 420, pp. 875-878.
9. Brown M.A., Tanzola M.B., Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. *Mol. Immunol.*, 2002, Vol. 38, pp. 1373-1378.
10. Csaba G., Pallinger E. Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T(3)) concentration in immune cells. *Inflamm. Res.*, 2009, Vol. 58, no. 3, pp. 151-154.
11. Gregory G.D., Brown M.A. Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity. *Methods in Molecular Biology*, 2006, Vol. 315, pp. 35-50.
12. Kristensen B. Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls. *Dan. Med. J.*, 2016, Vol. 63, no. 2, pii: B5177.
13. Marazuela M., Garcia-Lopez M.A., Figueroa-Vega N., de la Fuente H., Alvarado-Sánchez B., Monsiváis-Urenda A., Sánchez-Madrid F., González-Amaro R. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, Vol. 91, no. 9, pp. 3639-3646.
14. Nagayama Y., Saito O., McLachlan S.M., Rapoport B., Kano H., Kumazawa Y. TSH receptor-adenovirus-induced Graves' hyperthyroidism is attenuated in both interferon- γ and interleukin-4 knockout mice; implications for the Th1/Th2 paradigm. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 138, no. 3, pp. 417-422.
15. Piconese S., Gri G., Tripodo C. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17-cell differentiation. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 13, pp. 2639-2648.
16. Rao K.N., Brown M.A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, Vol. 1143, pp. 83-104.
17. Rocchi R., Kimura H., Shey-Cherng Tzou, Suzuki K., Rose N.R., Pinchera A., Ladenson P.W., Caturegli P. Toll-like receptor-MyD88 and Fc receptor pathways of mast cells mediate the thyroid dysfunctions observed during nonthyroidal illness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 14, pp. 6019-6024.
18. Sayed B.A., Christy A., Quirion M.R., Brown M.A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annual Review of Immunology*, 2008, Vol. 26, pp. 705-739.
19. Steiner D.R., Gonzalez N.C., Wood J.G. Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* (1985), 2003, Vol. 94, no. 1, pp. 325-334.
20. Sun L., Zhang X., Dai F., Shen J., Ren C., Zuo C., Zhang Q. Elevated interleukin-1 β in peripheral blood mononuclear cells contributes to the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, especially of Hashimoto thyroiditis. *Endocr. Res.*, 2016, Vol. 41, no. 3, pp. 185-192.
21. Yaglova N.V. Disorders in the secretory cycle of follicular thyrocytes and their correction with thyrotropic hormone in experimental non-thyroidal illness syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, Vol. 152, no. 2, pp. 253-257.
22. Yunzhi Xu, Guangjie Chen. Mast cell and autoimmune diseases. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 1, pp. 1-8.
23. Zheng J.M., Yao G.H., Cheng Z., Wang R., Liu Z.H. Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: a study of patients at different stages of the disease. *Diabetologia*, 2012, Vol. 55, no. 3, pp. 801-811.

Авторы:

Здор В.В. — к.м.н., научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, кафедра нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Гельцер Б.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, Школа биомедицины, директор Департамента фундаментальной и клинической медицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; советник ректора по науке и инновациям ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Поступила 20.11.2016

Отправлена на доработку 24.11.2016

Принята к печати 01.12.2016

Authors:

Zdor V.V., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Geltser B.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, School Biomedicine, Director, Department of Fundamental and Clinical Medicine, Far Eastern Federal University; Advisor to the Rector for Science and Innovation, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Received 20.11.2016

Revision received 24.11.2016

Accepted 01.12.2016