

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЖЕЛЕЗАХ ВНУТРЕННЕЙ СЕКРЕЦИИ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛЕТКАМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА – МАСТОЦИТАМИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

© 2018 г. В. В. Здор^{1*}, Е. В. Маркелова¹, В. В. Фадеев²,
Я. Н. Тихонов¹

*E-mail: victoria.zdor@mail.ru

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Владивосток, Россия;

²ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
Минздрава РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Поступила: 23.04.2018. Принята: 28.08.2018

Исследование патоморфологических изменений в железах внутренней секреции при аутоиммунных тиреопатиях, морфофункциональная характеристика клеток врожденного иммунитета – мастоцитов, участвующих в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, является актуальной научной задачей. На основании комплексной характеристики состояния эндокринных желез и интратиреоидных мастоцитов при экспериментальном тиреотоксикозе у животных определены возможные механизмы активации и взаимодействия мастоцитов и тиреоцитов. В экспериментальном исследовании оценивали сывороточный уровень тиреоидных гормонов, антител к ТТГ-рецепторам у здоровых и экспериментальных животных с помощью современных электрохемилюминисцентных методов детекции, проводили морфологическую верификацию состояния щитовидной железы, надпочечников, гипофиза с помощью гистохимического, иммуногистохимического методов с применением светового, электронного, конфокального лазерного сканирующего микроскопов. При экзогенном тиреотоксикозе получили активную инфильтрацию и дегрануляцию мастоцитов в ткани ЩЖ, достоверно отличавшуюся от контроля. Активация мастоцитов проявлялась в контактировании с тиреоидным эпителием, особенно в фокусах микрофолликулярной пролиферации тиреоцитов. При иммуногистохимическом исследовании с использованием моноклональных видоспецифичных антител к триптазе обнаружены интра- и перифолликулярно активированные мастоциты в тиреоидной ткани при индуцированном тиреотоксикозе. При тиреотоксикозе активированные мастоциты экспрессировали костимулирующие молекулы CD86, это подтверждено с помощью видоспецифичных моноклональных антител к CD86. Активное участие мастоцитов в патоморфологических изменениях при индуцированном тиреотоксикозе, свидетельствует об их важной роли в патогенезе аутоиммунных тиреопатий. Ингибирование дегрануляции мастоцитов может быть реальной задачей патогенетической терапии данной патологии.

Ключевые слова: экспериментальный тиреотоксикоз, щитовидная железа, мастоциты, CD86

DOI: 10.31857/S102872210002373-5

Адрес: 690106, Владивосток, проспект Острякова 4, Здор Виктория Владимировна.

Тел.: +79147919625 (моб.). E-mail: victoria.zdor@mail.ru

Авторы:

Здор В. В., к.м.н., научный сотрудник ЦНИЛ ФГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

Маркелова Е. В., д.м.н., профессор зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

Фадеев В. В., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой эндокринологии Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова Минздрава РФ, Москва, Россия;

Тихонов Я. Н., ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Данные об участии клеток врожденного иммунитета в патогенезе аутоиммунных заболева-

ний щитовидной железы (АИЗЩЖ) до настоящего времени достаточно немногочисленны. Мастоциты (МС) могут выполнять функцию специфического микроокружения для тиреоцитов, наряду с симпатическими нервными волокнами, макрофагами и фибробластами, но точная роль этих клеток врожденного иммунитета в патологии щитовидной железы (ЩЖ) неизвестна до сих пор, не полностью исследованы механизмы активации МС в ЩЖ и способы их взаимодействия с тиреоидным эпителием при изменениях тиреоидного статуса [1]. Основными антигенпрезентирующими клетками (АПК) при аутоиммунном тиреотоксикозе (болезни Грейвса, БГ) и аутоиммунном тиреоидите на сегодняшний день считаются дендритные клетки [1, 2]. Однако, в ряде исследований было представлено, что как тиреоциты, так и МС при аутоиммунных тиреопатиях могут экспрессировать молекулы МНС класса II, а МС – и молекулы МНС I класса [3, 4]. Более того, МС с большой вероятностью, могут участвовать в антигенпрезентации тиреоидных аутоантигенов, так как несут на своей поверхности не только МНС-II, но и костимулирующие молекулы CD86 [5]. Известно, что МС локализируются в межфолликулярной тиреоидной соединительной ткани, близки к капиллярам, они способны изменять функциональное состояние мембран тиреоцитов с помощью продуцируемых ими биогенных аминов, а специфический только для МС фермент – триптаза, содержащаяся в их гранулах, может также непосредственно активировать фибробласты [6].

В последние годы интенсивно обсуждается важная роль клеток врожденного иммунитета в патогенезе АИЗЩЖ, активное внимание исследователей привлекают МС, обнаруживаемые при морфологическом исследовании ЩЖ пациентов с аутоиммунными тиреопатиями, и влияющие на иммунорегуляторные процессы и адаптивный иммунитет [1, 7]. Обнаруженная активация интратиреоидных МС при создании экзогенного тиреотоксикоза и острого грамотрицательного бактериального эндотоксикоза дополнительно подтверждает тесную взаимосвязь тиреоидных гормонов, симпатoadренальной системы и интратиреоидных МС [8]. Кроме того, авторами было зафиксировано достоверное увеличение количества МС, инфильтрирующих слюнные железы животных при экспериментальном гипотиреозе, индуцированным введением животным метимазола [9]. Существенно, что при этом МС, являясь высокоспециализированными клетками

системы иммунитета, имеют рецепторы к трийодтирониону и ТТГ [10, 11]. Учитывая эти данные, можно предположить наличие взаимосвязи между функциональной активностью ЩЖ и МС. Вместе с тем, полученные в ранее проведенных исследованиях данные не проясняют полностью механизмы и пути взаимодействия МС и тиреоцитов при изменениях тиреоидного статуса, а также точную роль и место этих иммуноцитов в патогенезе аутоиммунных тиреопатий. В задачи данного исследования входило: на основании морфофункциональной характеристики состояния эндокринных желез (ЩЖ, надпочечники, гипофиз) и интратиреоидных МС при экспериментальном тиреотоксикозе у животных определить возможные механизмы активации и взаимодействия МС и тиреоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 6-ти месячных здоровых крысах-самках Wistar, выведенных в условиях вивария ДВО РАН и с исходной массой тела 245 ± 15 грамм. 6-ти месячные здоровые крысы-самки Wistar, наблюдавшиеся в течение 1 месяца до начала эксперимента и далее ежедневно с момента включения в исследование, были разделены на три группы: первая – индуцированного тиреотоксикоза (с помощью введения натошак за час до утреннего кормления левотироксина натрия в дозе 50 мкг/кг массы тела – 12,5 мкг в сутки, растворенного в 1 мл физиологического раствора), вторая группа индуцированного (тем же способом) тиреотоксикоза на фоне применения ПЛ-2 (с 20 дня эксперимента, подкожные инъекции рекомбинантного ветеринарного ПЛ-2 «Ронколейкин» (в 1 ампуле 50000 МЕ), выделенного из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, по схеме – 0,1 мл (5000 МЕ) с интервалом в 72 часа, всего 5 инъекций в течение 14 дней) [12] и группа контроля (условия содержания и рацион питания идентичные первым двум группам). Животные ранжировались по 10 голов женского пола в каждой из групп. Длительность эксперимента составила 35 суток. По окончании эксперимента после применения общего наркоза для животных, участвующих в исследовании, для анализа тиреоидного статуса и аутоантител забирали кровь путем венепункции периферической хвостовой вены в условиях лаборатории – образцы в объеме 3 мл для получения сыворотки крови, также производился забор тканей ЩЖ, надпочечников и гипофиза.

В эксперименте руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Директива 86/609 ЕЭС от 24 ноября 1986 г.) при строгом соблюдении требований Европейской конвенции (ETS № 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, также выведению их из эксперимента и утилизации. Выведение животных из эксперимента в Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России; исследование гистологического материала в институте биологии моря ДВО РАН, на кафедре патологической анатомии, судебной медицины и права и в ЦНИЛ ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 3/13, 2013).

У всех животных методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах определяли ТГ и аутоантитела к ТТГр с использованием диагностических наборов фирмы "Roche diagnostics", Швейцария (на автоматизированной системе Cobas e601 фирмы Хоффман Ла Рош, реагенты линии Elecsys-технологии II поколения). Содержание указанных маркеров в сыворотке крови измерялось: ТГ (свободный Т3 и свободный Т4) в пмоль/л, антитела к ТТГр в МЕ/л. Морфометрическое исследование ЩЖ животных проводилось с использованием светоптического микроскопа («Carl Zeiss & MT», Германия), с подсчетом количества МС в единице площади ЩЖ при помощи лицензионной морфометрической программы «ImageJ 1.46» и «Motic Images Plus, 2.0». При гистохимическом исследовании – парафиновые срезы препаратов ЩЖ, гипофизов и надпочечников животных, толщиной 5–7 мкм, окрашивались гематоксилин-эозином, азотнокислым серебром и толуидином синим и изучались под светоптическим микроскопом («Carl Zeiss & MT», Германия). Иммуногистохимический метод исследования (ИГХ) применяли на депарафинированных, обезвоженных срезах послеоперационного материала (ЩЖ) и проводили демаскировку антигенных детерминант в СВЧ-печи в 0,01М цитратном буфере. Иммуноокрашивание проводилось стрептавидин-биотиновым пероксидазным методом. Хромогеном служил DAB+ (система «Novolink», производитель «Novocastra», Великобритания). Срезы инкубировали 24 часа с первичными моноклональными антителами: к Ki-67 Antigen

(Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen. Clone MIB-5), моноклональные антитела к триптазе (фирма Dako) и антитела к CD86 (моноклональные Rabbit Anti-CD86, фирмы «Abcam»). Вторичные антитела – антивидоспецифичные меченные Alexa 488 и 546. Ядерная ДНК тиреоцитов докрашивали ДАПИ. Использовали негативный контроль (окрашивание без первичных антител). Ставили позитивные и негативные контроли. При морфологическом исследовании ЩЖ животных последнюю взвешивали на торсионных весах. Проводилась также оценка ядрышкового организатора (NOR – региона) в ядрах тиреоцитов, клетках мозгового и коркового вещества надпочечников, клетках гипофиза, что было необходимо для выявления популяции пролиферирующего пула клеток. Метод основывается на осаждении и прочном связывании белков (гистонов), расположенных на акроцентриках сателлитных хромосом с ионами серебра (AgNO_3). Результаты окрашивания серии препаратов оценивали микроскопией на увеличении в 100, 200, 400 раз. Анализ гистологического материала проводили также с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 («Carl Zeiss & MT», Германия). Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов, программа SPSS Statistics, v.17.0.1 (SPSS Inc., США; рег. номер «3-blWdC-7k32t»). Предварительно была сделана проверка на нормальность распределения значений всех исследуемых признаков во всех группах с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение значений в малых выборках для проверки различий между двумя выборками парных измерений производили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (W-критерий). Для анализа различий между группами в случаях аномального распределения данных применяли коэффициент Манна-Уитни (U-тест) с поправкой Бонферрони для малых статистических групп. Возможные взаимосвязи между исследуемыми показателями изучали с помощью корреляционного анализа, применяли коэффициент корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе гистологических препаратов ЩЖ контрольной группы было выявлено, что ЩЖ у них имели средне-вакуольный и крупно-вакуольный тип строения. При морфометрии средний диаметр фолликулов составил $60,12 \pm 12,5$ мкм. Фолликулярный эпителий был низ-

ким призматическим или кубическим, в единичных случаях определялась пролиферация эпителия в виде «подушек Сандерсона» и формирование микрофолликулов, не содержащих коллоид. Коллоид в большинстве фолликулов был компактный, интенсивно окрашенный, без признаков активной резорбции. При экспериментальном тиреотоксикозе ЩЖ гистологически имели средне- и крупновакуольный тип строения. В них преобладали фолликулы среднего и мелкого калибра (морфометрия фолликулов: $55,20 \pm 10,29$ мкм). Фолликулярный эпителий был низким призматическим (в 70% случаев), в меньшей степени (в 30% случаев) — кубическим. Проллиферация эпителия наблюдалась преимущественно в виде активного образования микрофолликулов, не содержащих коллоида, сформированных из округлых клеток со светлой цитоплазмой и крупным ядром. Коллоид в большинстве фолликулов был «жидкий», слабо окрашенный, с очаговой прикраевой вакуолизацией. В некоторых полях зрения в I группе — коллоид практически отсутствовал, в просвете фолликулов обнаруживались лишь «хлопьевидные остатки». В 20% случаев в I группе зафиксирована мелкоочаговая лимфоидная инфильтрация паренхимы ЩЖ. ЩЖ животных, получавших рекомбинантный IL-2 (II группа), имели средне- и крупновакуольный тип строения (морфометрия фолликулов: $74,18 \pm 15,41$ мкм). В большинстве препаратов отмечалось наличие плотного, интенсивно окрашенного, компактного коллоида, без признаков активной резорбции. В 2-х случаях наблюдался микрофолликулярный тип строения ЩЖ и диффузная прикраевая вакуолизация коллоида. У них же была выявлена пролиферация эпителия в виде «подушек Сандерсона». Кроме того, в трех случаях из II группы была выявлена очаговая лимфоидная инфильтрация ЩЖ, без формирования лимфоидных

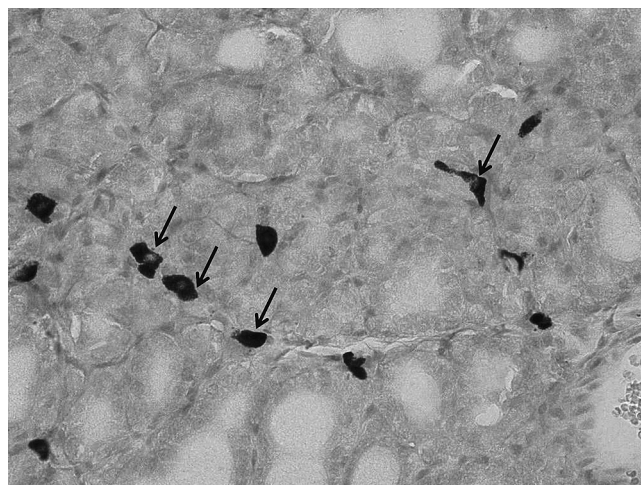


Рис. 1. Щитовидная железа крысы с тиреотоксикозом. Интер- и перифолликулярно — группы дифференцированных мастоцитов (стрелки), единичные в состоянии дегрануляции цитоплазмы. Окраска — толуидиновым синим. Ув. х 200.

фолликулов и светлых центров. В 35-суточном эксперименте при индуцированном тиреотоксикозе (в I и во II-й группах) не выявлено активной пролиферации тиреоцитов, но зафиксирована очаговая инфильтрация ЩЖ животных мастоцитами (Рис. 1, 2). При ИГХ исследовании с использованием моноклональных видоспецифичных антител к триптазе — нейтральной протеазе, содержащейся исключительно в мастоцитах — было подтверждено наличие интра- и перифолликулярно активированных МС в ткани ЩЖ животных при индуцированном тиреотоксикозе и при тиреотоксикозе на фоне IL-2. Активность МС проявлялась в дегрануляции и контактировании с фолликулярным эпителием ЩЖ, особенно в фокусах микрофолликулярной пролиферации тиреоцитов, вероятно, путем молекулярного способа выделения секреторного материала. Оценивая при морфометрии степень

Таблица. Морфофункциональная характеристика МС в ЩЖ у животных в группах

Группы животных	Морфофункциональные показатели ЩЖ	
	Количество МС в 1 мм ²	Индекс дегрануляции МС
Контроль (n=10)	$2,75 \pm 0,31$	$3,14 \pm 0,02$
I группа (n=10)	$12,56 \pm 1,20^{**}$	$5,56 \pm 0,03^*$
II группа (n=10)	$5,75 \pm 0,21^{*#}$	$3,90 \pm 0,11^{*#}$

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 ($p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни).

инфильтрации ЩЖ мастоцитами и активность их дегрануляции, был проведен количественный анализ МС с подсчетом индекса их дегрануляции в ЩЖ у животных всех групп (табл. 1).

При экспериментальном тиреотоксикозе в ткани надпочечников в клубочковой и пучковой зонах обнаружено появление высокого процента клеток с амитотической активностью с пролиферативной фазой клеточного цикла. В препаратах надпочечников существенных отличий в количестве NOR-гранул, между ядрами клеток при тиреотоксикозе I и II-й групп не обнаружено. В группах I и II-й сохранялась одинаковая закономерность количества и размерности гранул NOR. В клубочковой зоне надпочечников, где всегда выше количество NOR и меньший их размер ("пылевидный"), митозов не обнаружено, идентичная картина наблюдалась в суданофобном слое. В пучковой зоне гранулы NOR были крупнее и количество их меньше, митозы также не были обнаружены. В сетчатой зоне надпочечников гистологическая картина была идентична пучковой зоне. В мозговом слое надпочечников экспериментальных животных с тиреотоксикозом (I-я и II-я группы) количество ядер с большим количеством NOR-гранул малых размеров преобладало над количеством ядер с меньшим числом NOR-гранул и увеличением их размера ($p < 0,05$), т.е. гистохимические исследования надпочечников экспериментальных животных с тиреотоксикозом (I, II группы) показали отсутствие либо редуцирование (гипоплазию) суданофобного слоя коры надпочеч-

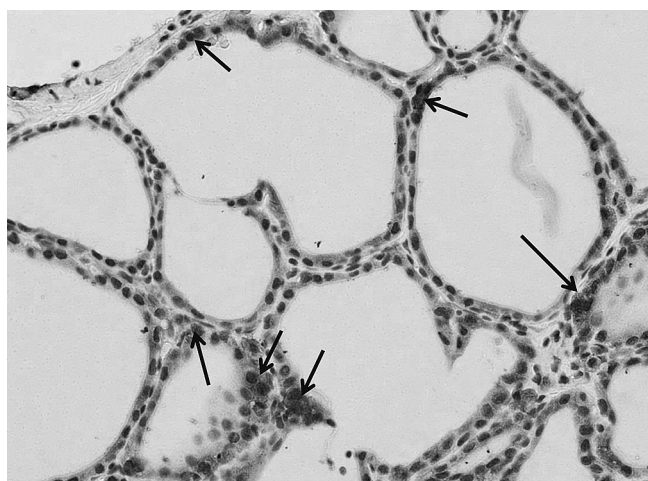


Рис. 2. ЩЖ крысы с тиреотоксикозом. ИГХ с моноклональными антителами к CD 86. Гиперэкспрессия CD86 в непосредственной близости к тиреоцитам (стрелки). Ув. х 400.

ников по сравнению со здоровыми животными. В группе с тиреотоксикозом (I-ая группа) зафиксированы признаки более интенсивного окрашивания цитоплазмы клеток пучковой зоны надпочечников, которая была умеренно гипертрофирована, но мастоцитарной инфильтрации не было выявлено. Для морфологической верификации возможных изменений ткани гипофиза применяли реакцию серебрения. Во всех клеточных структурах обеих групп экспериментальных животных и в препаратах группы контроля присутствовала формация передней доли гипофиза (аденогипофиз), контурировалась промежуточная доля гипофиза и более отчетливо проявлялась его задняя доля. При сравнении клеток различных долей гипофизов животных отличий в окрашивании гранул NOR в ядрах клеток не обнаружено. Не отмечалось также количественных и качественных различий в соотношении популяций клеток с мелкодисперсным ядрышковым организатором (NOR) и «крупно-гранулярным» ядрышковым организатором (NOR). В аденогипофизе крыс I группы наблюдались признаки повышения пролиферативной активности клеток, что может быть связано с компенсаторным снижением функциональной активности и повышением пролиферативной активности тиреотрофов в ответ на введение в организм здорового животного ТГ. Мастоцитарной инфильтрации тканей гипофиза и надпочечников при экзогенном тиреотоксикозе и у здоровых животных зафиксировано не было.

Существенно, что при изучении морфофункциональных свойств МС при экзогенном тиреотоксикозе (I-ая и II-ая группы) при помощи ИГХ исследований с использованием видоспецифичных моноклональных антител к CD86 и к триптазе в ЩЖ крыс этих групп, в отличие от контроля (рис. 3), были обнаружены иммунопозитивные мастоциты с экспрессией CD86 (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленная в эксперименте активация и дегрануляция тканевых МС в интер- и перифолликулярном пространстве ЩЖ, экспрессия ими CD86 молекул при индуцированном изменении тиреоидного статуса у экспериментальных животных предполагает участие этих иммунных клеток в патогенезе аутоиммунных тиреопатий путем взаимодействия с тиреоцитами после изменений тиреоидного статуса (рис. 1, 2). Как известно, МС, обнаруженные в ЩЖ животных с экспериментальным тиреотоксикозом,

имеют ТТГ рецепторы, а триптаза МС может непосредственно активировать фибробласты, взаимодействуя с протеаз-активируемым рецептором 2 типа [9]. При этом, активировать МС и способствовать их дегрануляции могут различные молекулы [13], в том числе ТГ, что было доказано в нашем эксперименте. Зафиксированная активация тканевых МС в ЩЖ исходно здоровых животных при индуцированном тиреотоксикозе подтверждает иммунорегуляторную роль ТГ и, возможно, их способность являться первичным аутоантигеном в патогенезе АИЗЩЖ. Наличие гистамина в везикулах МС и гистамин-специализированных рецепторов в гипоталамусе, взаимосвязь гипоталамического тиреолиберина и ТТГ, наличие рецепторов к ТТГ и способность выработки Т3 в иммунocyтах [13], участие рецептора ТТГ в аутоиммунном процессе при АИЗЩЖ как аутоантигена, а также подтвержденная нами экспрессия CD86 мастоцитами при изменениях уровня ТГ, не исключает способность мастоцитов являться АПК при аутоиммунном тиреотоксикозе. Известно, что на поверхности МС, помимо идентифицированных костимулирующих молекул CD86, присутствуют молекулы МНС II класса, что в свою очередь позволяет утверждать о способности МС выполнять функции АПК в ЩЖ при системном изменении уровня ТГ и рассматривать их как объект для патогенетической терапии при АИЗЩЖ. Кроме того, наши данные не вступают в противоречие с классическими представлениями о роли МС в иммунном ответе [5]. Более того, по мнению ряда авторов, через активиро-

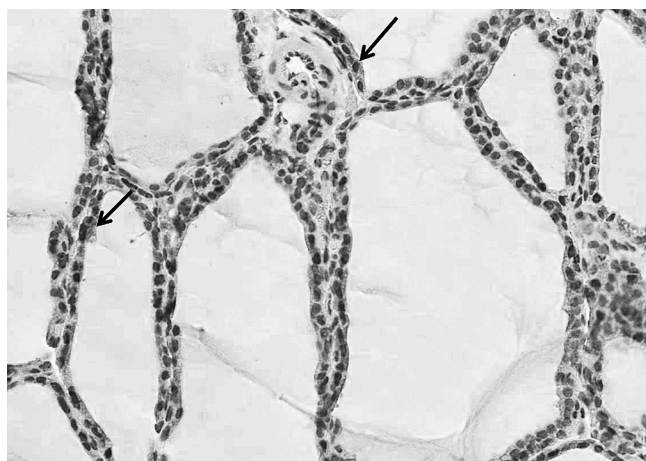


Рис. 3. Щитовидная железа контрольной крысы. Экспрессия CD86 слабая (стрелки) или практически не зафиксировано. ИГХ исследование, ув. х 400.

ванные TLR-4, имеющиеся на МС, бактериальный липосахарид может напрямую влиять на фолликулярные клетки ЩЖ и вызывать активацию или подавление разных фаз секреции ТГ в ЩЖ, приводя тем самым к повышению синтеза Т3 и Т4, и/или изменению как минимум концентрации тиреоглобулина [14]. Известная роль МС в аллергических реакциях в последние годы дополняется данными, подтверждающими роль МС в регуляции физиологических и патологических реакций Т-клеток при изменении функционального состояния фолликулярного эпителия ЩЖ. Более того, учитывая, что МС могут быть локализованы в терминалях нервных волокон, обеспечивающих катехоламинергическую иннервацию [15], то стресс и / или нарушенная концентрация ТГ может способствовать дегрануляции МС на фоне дестабилизации их мембран, и приводить к выделению гистамина, триптазы, нарушению иммунологической толерантности к компонентам ЩЖ с последующей презентацией вызвавшего эту нестабильность антигена самостоятельно МС или с помощью их воздействия на созревание дендритных клеток, а также пролиферацию лимфоцитов [16, 17].

Более того, наличие молекул МНС обоих классов и экспрессия костимулирующих молекул CD86 и CD80 на МС, обеспечивает их взаимодействие с иммунocyтами [5, 17]. Дегранулирующие и неактивные МС, как доказано в исследованиях А.К Palm с соавт. (2016), могут активировать В-клетки, повышая их пролиферацию и экспрессию ими CD19, МНС класса II и CD86, а также стимулировать секрецию IgM (+) В-клетками IgM и IgG [18]. В этом исследовании было доказано, что МС и В-клетки имеют в этом случае межклеточные контакты, которые поддерживают оптимальную активацию В-клеток и способствуют дифференцировке В-клеток в эффекторные клетки. Обсуждается, что один из механизмов, с помощью которого МС влияют и на функцию Т-клеток, опосредован секретцией оппозитных цитокинов, через которые МС могут непосредственно активировать Т-клетки. Возможно, это происходит через презентацию аутоантигена, но экспрессия МНС класса II мастоцитами до настоящего времени оспаривалась [13]. В нашем эксперименте при ИГХ исследовании ЩЖ с помощью видоспецифичных моноклональных антител к триптазе и CD86 (рис. 2, 3) обнаружены активно дегранулирующие и экспрессирующие CD86 мастоциты в ЩЖ ни только при индуцированном ти-

реотоксикозе, но и при тиреотоксикозе на фоне стимуляции IL-2.

Однако считается, что в ЩЖ чаще «профессиональными» АПК являются дендритные клетки, которые поглощают антиген, процессируют и представляют на своей поверхности в комплексе с молекулами МНС I или II класса. Усиление экспрессии костимулирующих молекул B7 (CD80 и CD86) на дендритных клетках происходит при распознавании образов патогенности и требует дополнительной активации со стороны клеток врожденного иммунитета, которыми и могут являться обнаруженные нами в ЩЖ экспериментальных животных в повышенном количестве дегранулирующие МС (табл.). Более того, МС и незрелые дендритные клетки находятся в тесном контакте в периферических тканях, после активации МС высвобождают триптазу, гистамин и другие медиаторы, которые могут индуцировать экспрессию CD86, CD80 и МНС класса II на незрелых дендритных клетках, участвующих в локальной стимуляции Т-клеток [19]. Только после этого Т-клетки способны распознать антиген, и вслед за этим активироваться и развить иммунный ответ.

Таким образом, активное участие клеток врожденного иммунитета — МС в патоморфологических изменениях ЩЖ при экспериментальном тиреотоксикозе, предполагает важную роль этих клеток в патогенезе АИЗЩЖ. Ингибирование дегрануляции МС может стать одной из реальных задач патогенетической терапии при данной аутоиммунной патологии. Следовательно, МС входят в единую систему регуляции физиологических функций организма также при изменении тиреоидного статуса, например, при действии экстремальных факторов с помощью активной дегрануляции в ткани ЩЖ и участия в функции презентации аутоантигенов. Возможно интегрирование этих механизмов в иммунопатогенез аутоиммунных тиреопатий, что будет способствовать оптимизации индивидуальных схем терапии пациентов, а дальнейшее изучение проблемы позволит провести поиск эффективных схем терапии, в том числе с использованием стабилизаторов мембран МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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, 1143, 83–104. doi: 10.1196/annals.1443.023.
2. Gigena N., Alamino V. A., Montesinos M. D., Nazar M., Louzada R. A. Wajner S. M., Maia A. L., Masini-Rep-

iso A. M., Carvalho D. P., Cremaschi G. A., Pellizas C. G. Dissecting thyroid hormone transport and metabolism in dendritic cells. *J Endocrinol*. 2017, 232(2), 337–350. doi: 10.1530/JOE-16-0423.

3. Corthay A. A. Three-cell model for activation of naïve T helper cells. // *Scand J. Immunol*. 2006, 64(2), 93–96.
4. Gaudenzio N., Espagnolle N., Mars L. T., Liblau R., Valitutti S., Espinosa E. Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse. *Blood* 2009, 114(24), 4979–88. doi: 10.1182/blood-2009-02-202648.
5. Ярилин А. А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 59–62. [Yarilin A. A. Immunology. Moscow: “GEOTAR-Media” 2010, 59–62 (In Russ)].
6. Здор В. В., Гельцер Б. И., Маркелова Е. В. Роль мастоцитов в патогенезе аутоиммунного воспаления щитовидной железы. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2016, 3, 12–15. [Zdor V. V., Geltser B. I., Markelova E. V. The role of mast cells in the pathogenesis of autoimmune thyroid inflammation. *Pacific Medical Journal* 2016, 3, 12–15].
7. Gregory G. D., Brown M. A. Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity. *Methods in Molecular Biology* 2006, 315, 35–50.
8. 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, 2, 229–232. [Yaglova N. V., Yaglov V. V. Ultrastructural characteristics of molecular release of secretory products from thyroid mast cells induced by lipopolysaccharide. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013, 155(2), 229–233].
9. Hayat N. Q., Tahir M., Munir B., Sami W. Effect of methimazole-induced hypothyroidism on histological characteristics of parotid gland of albino rat. *Ayub. Med. Coll. Abbottabad*. 2010, 22(3), 22–27.
10. Arpin C., Pihlgren M., Fraichard A., Aubert D., Sammarut J., Chassande O., Marvel J. Effects of T3Ra1 and T3Ra2 gene deletion on T and B lymphocyte development. *Immunol*. 2000, 164(1), 152–160.
11. Siebler T., Robson H., Bromley M., Stevens D. A., Shallet S. M., Williams G. R. Thyroid status affects number and localization of thyroid hormone receptor expressing mast cells in bone marrow. *Bone* 2002, 30(1), 259–66. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00631-7](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00631-7).
12. Моисеев А. Н., Сахарова Е. Д., Егорова В. Н., Романова О. В. Ронколейкин: опыт клинического применения у мелких домашних животных. Санкт-Петербург: Альтер Эго, 2012, 3–20. [Moiseev A. N., Sakharova E. D., Egorova V. N., Romanova O. V. Roncoleukin: clinical experience in small pets. St. Petersburg: Alter Ego, 2012, 3–20].
13. Yunzhi Xu, Guangjie Chen. Mast Cell and Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. 2015, 246126. Published online 2015. doi: 10.1155/2015/246126.PMID: PMC4402170.
14. Яглова Н. В., Бerezov T. T. Regulation of thyroid and pituitary functions by lipopolysaccharide. *Biomed Khim*. 2010, 56(2), 179–86.
15. Гусельникова В. В., Полевицков А. В. Нейро-мастоцитарные взаимодействия в тимусе. *Вестник Уральского*

- ской медицинской академической науки, 2014, 3(49), 23–25. [Guseynikova V. V., Polevshchikov A. V. Neuro-mast cells interactions in the thymus. Bulletin of the Ural Medical Medical Science, 2014, 3 (49), 23–25].
16. Dudeck A., Suender C. A., Kostka S. L., von Stebut E., Maurer M. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* 2011, 41(7), 1883–1893. doi: 10.1002/eji.201040994.
 17. Ma Y. Y., Yang M. Q., Wang C. F., Ding J., Li J. Y. Inhibiting mast cell degranulation by HO-1 affects dendritic cell maturation *in vitro*. *Inflamm. Res.* 2014, 63(7), 527–537. doi: 10.1007/s00011-014-0722-8.
 18. Palm A. K., Garcia-Faroldi G., Lundberg M., Pejler G., Kleinau S. Activated mast cells promote differentiation of B cells into effector cells. *Sci Rep.* 2016, 5, 6, 20531. doi: 10.1038/srep20531.
 19. Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Herbault N., Magistrelli G., Bonnefoy J. Y., Pestel J., Jeannin P. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *Immunol.* 2001, 166(10), 6000–6006.

MORFOLOGICAL CHANGES IN ENDOCRINE GLANDS, THEIR INTERRELATION WITH CELLS OF INNATE IMMUNITY AT THE EXPERIMENTAL THYROTOXICOSIS

© 2018 V. V. Zdor^{1*}, E. V. Markelova¹, V. V. Fadeev²,
Ya. N. Tikhonov¹

*E-mail: victoria.zdor@mail.ru

¹FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health
of the Russian Federation, Vladivostok, Russia;

²First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov Ministry of Health
of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Received: 23.04.2018. **Accepted:** 28.08.2018

The study of the pathomorphological changes in the glands of internal secretion in autoimmune thyroid diseases, morphological functional characteristics of cells of innate immunity – mast cells, involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, is an actual scientific task. Based on the complex characteristics of the state of endocrine glands and intrathyroid mast cells in experimental thyrotoxicosis in animals, the goal was to determine mechanisms of activation and interaction of mastocytes and thyrocytes. In the experimental study, the serum level of thyroid hormones and antibodies to TSH receptors was measured in healthy and experimental animals using modern electro chemiluminescent detection methods, and morphological verification of the state of thyroid, adrenal and pituitary glands was performed by histochemical, immunohistochemical methods with the use of the light, electronic and confocal laser scanning microscopes. In exogenous thyrotoxicosis, active infiltration and degranulation of mast cells in the thyroid, significantly different from control group, were obtained. Activation of mast cells was manifested in contact with thyroid epithelium, especially in the foci of micro follicular proliferation of thyroid cells. Immunohistochemical study using monoclonal species-specific antibodies to tryptase revealed intra- and perifollicular activated mastocytes in thyroid tissue in induced thyrotoxicosis. In thyrotoxicosis, activated mast cells expressed CD18 costimulatory molecules, confirmed by species-specific monoclonal antibodies to CD86. The active involvement of mast cells in pathomorphological changes in induced thyrotoxicosis testifies to their important role in the pathogenesis of autoimmune thyreopathies. Inhibition of degranulation of mast cells can be a real goal of pathogenetic therapy of this pathology.

Key words: experimental thyrotoxicosis, thyroid gland, mast cells, CD86

Authors:

Zdor V. V., ☒ PhD, candidate of sciences, scientific employee of the central research laboratory FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russia;

690106, Russia, Vladivostok, Ostryakova Avenue, 4. **E-mail:** victoria.zdor@mail.ru;

Markelova E. V., MD, professor, Chair of Normal and Pathological Physiology Department, FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russia;

Fadeev V. V., MD, professor, Corresponding Member of RAS, Chair of Endocrinology Department, First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia;

Tikhonov Ya. N., assistant of the Department of Pathological Anatomy FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russia.