

Б 982

ISSN 0365-9615

**БЮЛЛЕТЕНЬ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
БИОЛОГИИ  
И МЕДИЦИНЫ**

**2**

---

**2009**

4/2

## МОРФОЛОГИЯ И ПАТОМОРФОЛОГИЯ

### ТИРЕОИДНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ФНО-ЗАВИСИМОГО АПОПТОЗА И ФОРМИРОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

С.А.Калашникова, А.Н.Горячев, В.В.Новочадов, А.И.Щёголев\*

*Волгоградский государственный медицинский университет; \*Институт хирургии им. А.В.Вишневского РАМН, Москва*

Проведенное исследование на крысах с хронической эндогенной интоксикацией на разных сроках показало участие гормонов щитовидной железы в модулировании повреждения печени. Действие тиреоидной модуляции реализуется в виде увеличения индукции ФНО-апоптоза в клетках, усиления микроциркуляторных нарушений за счет усиления экспрессии нитрооксидсинтазы. Модуляция имеет количественный характер, утяжеляя повреждение печени.

**Ключевые слова:** *ФНО-зависимый апоптоз, хроническая эндогенная интоксикация, печень, тиреоидные гормоны, гипертиреоз*

В настоящее время одной из актуальных проблем в медицине является развитие полиорганной недостаточности у больных хроническими заболеваниями. Одним из звеньев патогенеза данной патологии является накопление в организме эндогенных токсинов, повреждающих органы-мишени: печень, почки и легкие. Повреждение последних приводит к нарушению обезвреживания и выведения токсинов, что реализуется в виде эндогенной интоксикации (ЭИ) [3].

Эндогенные токсины действуют также и на эндокринные органы, вовлекая их в патогенез ЭИ. Одним из таких органов является щитовидная железа. Влияние щитовидной железы на органы-мишени, в частности печень, реализуется за счет наличия большого количества ядерных рецепторов к тиреоидным гормонам в печеночных клетках. Большое количество мест связывания  $T_3$  и  $T_4$  обнаружено также в ядерном аппарате клеток Купфера, эндотелиоцитов сосудов и синусоидов [1].

Можно предположить участие тиреоидных гормонов в развитии цитопатических, сосудистых и фибропластических изменений печени. Однако вклад каждого из перечисленных факторов

остается до сих пор неизученным. Также остается открытым вопрос о соотношении явлений некроза и апоптоза клеток при формировании хронической патологии печени и участии гормонов щитовидной железы в данных процессах.

Цель исследования — установить закономерности влияния гормонов щитовидной железы на процессы апоптоза в печени при хронической ЭИ.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 75 нелинейных белых крысах обоих полов массой 180–210 г. Выбор, содержание животных, моделирование патологических процессов и выведение крыс из опыта осуществляли на основе базисных нормативных документов МЗ РФ и рекомендаций ВОЗ [5].

При моделировании хронической ЭИ у 25 животных была использована классическая модель с преимущественным поражением печени, основанная на комбинированном введении малых доз бактериального ЛПС и тетрахлорметана [4]. Для моделирования гипертиреоза 25 животным перорально вводили L-тироксин из расчета 100 мг/кг в сутки в течение 7 сут. Затем воспроизводили хроническую ЭИ в ее классической модели. Поддерживающая доза L-тироксина составила 25 мг/кг массы животного 1 раз в 5 сут.

Адрес для корреспонденции: angoryachev@yandex.ru. Горячев А.Н.

Контрольной группой служили интактные крысы. Животных выводили из эксперимента на 30, 60 и 90-е сутки путем передозировки нембутала.

Хроническую ЭИ верифицировали по следующим биохимическим показателям: содержанию в плазме веществ средней молекулярной массы (ВСММ) и их олигопептидных фракций, концентрации МДА, активности ацилазы печени и почек.

Концентрации тиреотропного гормона (ТТГ),  $T_3$  и  $T_4$  определяли в сыворотке крови методом ИФА с использованием системы "Stat Fax 2100/2600" ("AWARENESS Technology") наборами тест-систем "Вектор-Бест".

Морфологически исследовали ткани печени. С образцов тканей получали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Для выявления соединительной ткани использовали окрашивание по Ван-Гизону.

Для выявления процессов апоптоза в ткани печени использовали моноклональные антитела ("DakoCytomation") к антигенам NOS-3, TRAIL и caspase-3. Определение экспрессии NOS-3 (эндотелиальной нитроксидсинтазы) обусловлено тем, что генерируемый ею NO при взаимодействии с супероксид-анионом может приводить к образованию пероксинитрита ONOON, являющегося индуктором апоптоза. TRAIL был выбран как пусковой рецептор в индукции апоптоза при взаимодействии с ФНО- $\alpha$ . Значимость именно ФНО-зависимого пути в гибели клеток определяется высокой концентрацией ФНО- $\alpha$  при хронической ЭИ [2].

Использование каспазы (caspase-3) в качестве маркера апоптоза обусловлено тем, что данный антиген является ферментом с нуклеазной активностью. Степень его экспрессии коррелирует с явлениями деградации нуклеиновых кислот в ядре и цитоплазме клеток.

Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной демаскировкой антигенов, применяли позитивные и негативные контроли антигенов, а также негативные контроли антител.

Для количественной оценки морфологических изменений использовали программный пакет "Image Tool for Windows", v.3.00 ("UTHSCSA"). Морфометрии подвергали иммуногистохимические срезы для определения объемных долей иммунопозитивного материала.

Математическую обработку проводили непосредственно из общей матрицы данных "Microsoft Excel" с привлечением возможностей программ "STATGRAPH 5.1", определяли показатели средней, ее среднеквадратичного отклонения и ошибки репрезентативности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При моделировании хронической ЭИ на 30-е сутки эксперимента концентрация ВСММ и их олигопептидные фракции регистрировались на уровне, превышающем аналогичные показатели в контрольной группе в 2.69 ( $p<0.05$ ) и в 2.32 раза ( $p<0.05$ ) соответственно (табл. 1). В последующем содержание биохимических субстратов

**Таблица 1.** Биохимические показатели выраженности ЭИ у крыс в модели с хроническим введением ЛПС и тетрахлорметана ( $M\pm m$ )

Показатель	Контроль	Срок эксперимента, сутки		
		30-е	60-е	90-е
Без гипертиреоза				
ВСММ, усл. ед.	0.16 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.05*	0.49 $\pm$ 0.05*	0.51 $\pm$ 0.06*
Олигопептиды, мг/л	115.5 $\pm$ 13.8	268.5 $\pm$ 29.8*	289.4 $\pm$ 30.5*	291.0 $\pm$ 36.4*
МДА, ммоль/г липидов	5.33 $\pm$ 0.43	11.40 $\pm$ 0.94*	10.53 $\pm$ 1.25*	11.08 $\pm$ 1.35*
Ацилаза печени, мккат/г белка	27.91 $\pm$ 1.93	9.06 $\pm$ 0.87*	7.58 $\pm$ 0.73*	5.97 $\pm$ 0.68*
Ацилаза почек, мккат/г белка	35.61 $\pm$ 2.90	18.21 $\pm$ 1.78*	13.61 $\pm$ 1.45*	9.61 $\pm$ 1.12*
На фоне гипертиреоза				
ВСММ, усл. ед.	0.17 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.01**	0.63 $\pm$ 0.01**	0.66 $\pm$ 0.02*
Олигопептиды, мг/л	280.35 $\pm$ 7.08*	303.81 $\pm$ 11.7	296.67 $\pm$ 9.23	315.11 $\pm$ 1.7
МДА, ммоль/л	8.10 $\pm$ 0.71*	13.21 $\pm$ 1.01**	11.93 $\pm$ 0.91**	11.71 $\pm$ 0.8
Ацилаза печени, мккат/г белка	24.97 $\pm$ 1.03	8.53 $\pm$ 0.09**	6.31 $\pm$ 0.09**	4.57 $\pm$ 0.09**
Ацилаза почек, мккат/г белка	29.51 $\pm$ 1.21*	22.31 $\pm$ 1.17*	11.71 $\pm$ 0.78*	10.13 $\pm$ 0.11*

**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3:  $p<0.05$  по сравнению \*с исходным состоянием, \*\*показателем соответствующего срока без гипертиреоза.

ЭИ возрастало еще больше — в 3.18 и в 2.53 раза от соответствующих величин в контрольной группе — к 90-м суткам эксперимента ( $p < 0.01$ ).

Результаты, полученные при изучении биохимических маркеров хронической ЭИ, моделируемой на фоне исходного гипертиреоза, свидетельствовали о нарастании тяжести интоксикации. На 90-е сутки эксперимента концентрация ВСММ превышала аналогичные показатели у животных с хронической ЭИ без гормонального дисбаланса в 1.29 раза, а у крыс контрольной группы — в 4.13 раза ( $p < 0.01$ ). Аналогичные изменения зарегистрированы при определении олигопептидной фракции и МДА. Выявлено достоверное снижение ацилазы печени и почек у животных экспериментальных групп по сравнению с таковыми показателями у интактных и крыс с хронической ЭИ без гипертиреоза ( $p < 0.05$ ). Исходя из полученных данных, можно говорить о том, что гипертиреоз ухудшает течение хронической ЭИ.

Определение концентрации тиреоидных гормонов в системном кровотоке показало, что хроническая ЭИ сопровождается повышением уровня практически всех гормонов с максимальным подъемом на 60-е сутки (табл. 2).

Указанные изменения гормонального профиля свидетельствуют о повышенном тиреоидном статусе при хронической ЭИ. В группе животных с гипертиреозом уровень тиреоидных гормонов был еще выше.

При исследовании тканей печени при хронической ЭИ на 30-е сутки эксперимента развивались изменения по типу хронического токсического поражения печени с развитием гепатофиброза. Наблюдался умеренно выраженный склероз

перипортальных трактов, лимфогистиоцитарная инфильтрация новообразованной соединительной ткани.

Гепатоциты, расположенные центральнобулярно, были в состоянии вакуольной дистрофии, единичные из них — с явлениями кариопикноза и кариолизиса ядер. Клетки печени по периферии дольки повреждались в меньшей степени. Наряду с этим отмечено поражение малых вен и венул в виде разрастания волокнистой соединительной ткани стенок, пролиферации эндотелия с явлениями капилляризации синусоидов. Стенки сосудов и пространства Диссе находились в состоянии умеренного отека.

На 60-е сутки эксперимента также наблюдалось расширение портальных трактов и желчных капилляров, утолщение их стенок, в отдельных случаях — с желчными тромбами в просвете. Расположенные здесь в виде скоплений макрофагальные клетки находились в состоянии гипертрофии, содержали в своей цитоплазме коричнево-бурые гранулы пигмента.

Вблизи триад часть гепатоцитов имела признаки зернистой и вакуольной дистрофии, такие клетки образовывали фокусы. Ядра гепатоцитов были в состоянии пикноза и частично лизированы.

На 90-е сутки эксперимента при исследовании ткани печени было заметно нарушение структуры печеночной дольки с дисконформацией балочной структуры в отдельных ее участках. Триады были окружены достаточно развитой соединительной тканью, с нерезко выраженными явлениями лимфогистиоцитарной инфильтрации.

При исследовании ткани печени у животных с хронической ЭИ на фоне гипертиреоза было

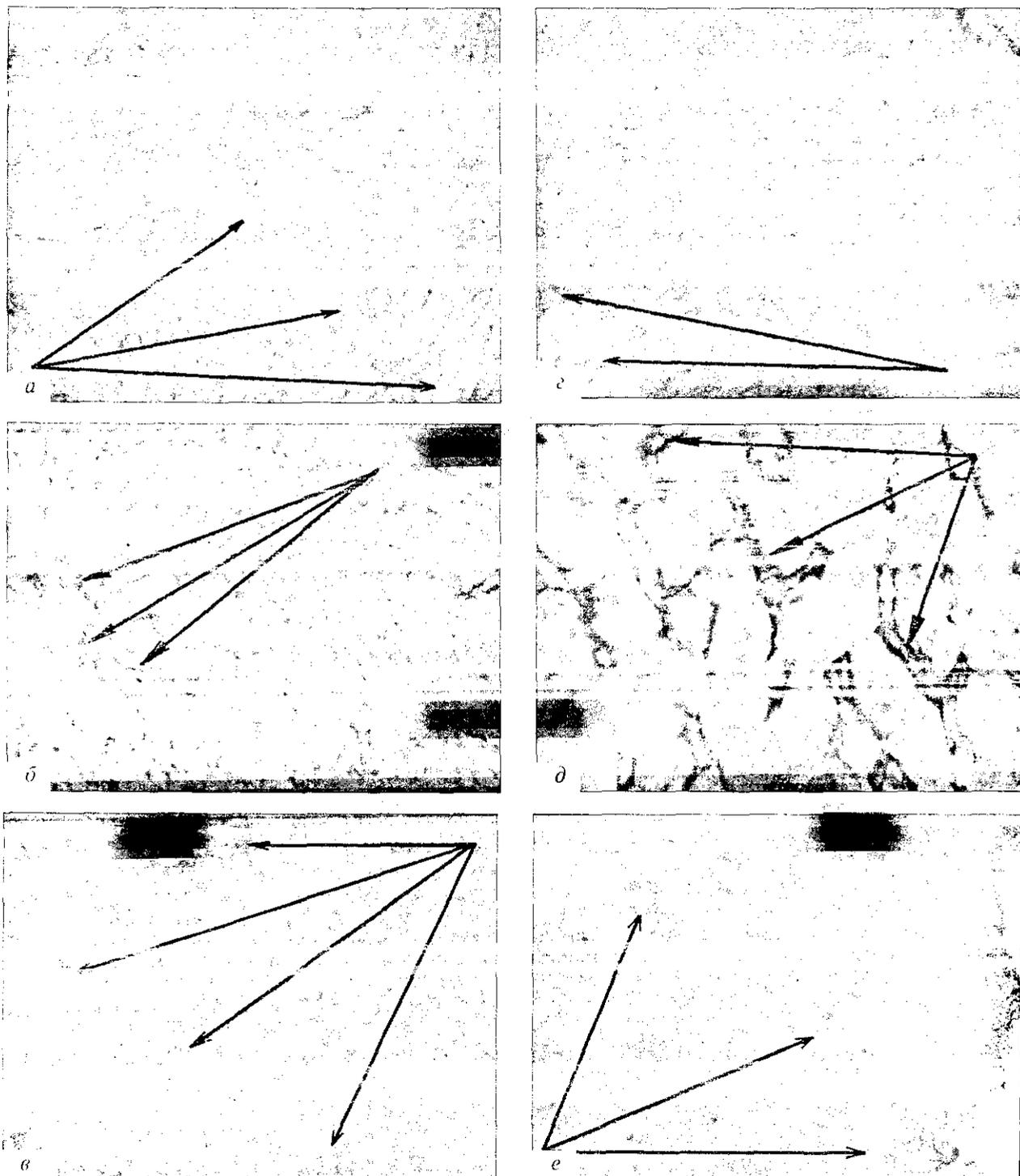
**Таблица 2.** Изменения профиля гормонов щитовидной железы в периферической крови у крыс при хронической ЭИ ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Срок эксперимента, сутки		
		30-е	60-е	90-е
Без гипертиреоза				
ТТГ, нмоль/л	1.53±0.32	1.56±0.6	1.01±0.3*	0.95±0.11*
T <sub>3</sub> общий, нмоль/л	10.2±0.9	10.84±0.70	12.45±1.10	8.84±0.90
T <sub>3</sub> свободный, пмоль/л	7.34±0.70	6.94±0.90	7.04±0.70	5.74±0.90
T <sub>4</sub> общий, нмоль/л	65.24±1.90	165.05±11.30*	114.35±10.10*	94.22±6.70*
T <sub>4</sub> свободный, пмоль/л	15.52±13.60	23.7±0.9*	13.66±0.70	12.63±0.90
На фоне гипертиреоза				
ТТГ, нмоль/л	1.10±0.09*	1.86±0.08**	1.01±0.09	2.51±0.04**
T <sub>3</sub> общий, нмоль/л	12.01±0.91*	12.84±0.70**	13.43±0.97**	10.51±0.11**
T <sub>3</sub> свободный, пмоль/л	6.52±0.91*	8.57±0.80**	6.92±0.91	9.21±1.01**
T <sub>4</sub> общий, нмоль/л	84.27±2.11*	129.15±9.30**	152.9±10.7**	133.08±9.30**
T <sub>4</sub> свободный, пмоль/л	13.26±0.80	21.25±0.89*	13.49±0.90*	13.32±0.89

выявлено более тяжелое течение заболевания по сравнению с классической моделью. Это выразилось в более раннем развитии баллонной дистрофии, прогрессировании склеротических повреж-

дений и возникновении дискомплексации балочной структуры уже к 60-м суткам.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии TRAIL на 30-е сутки эксперимента оп-



Печень при хронической ЭИ. Иммунопероксидазный метод.  
*а* — 90-е сутки. Антитела к TRAIL; *б* — 30-е сутки. Антитела к NOS-3; *в* — гипертиреоз, 60-е сутки. Антитела к TRAIL; *г* — 60-е сутки. Антитела к caspase-3; *д* — гипертиреоз, 90-е сутки. Антитела к NOS-3; *е* — гипертиреоз, 60-е сутки. Антитела к caspase-3. \*70 (*а-г, е*), \*280 (*д*).

ределялось накопление данного антигена в клетках печени, причем по гистотопографическому распределению наибольшее количество отмечалось в перипортальных зонах. Аналогичная картина прослеживалась и на 60-е сутки. К 90-м суткам интоксикации экспрессия TRAIL верифицировалась на всем порто-центральной направлении (рисунок, а).

При изучении гистотопографического распределения рецептора к ФНО- $\alpha$  при хронической ЭИ на фоне гипертиреоза определялись скопления клеток, экспрессирующих TRAIL по всем отделам долек, уже к 30-м суткам. На дальнейших сроках происходило увеличение количества клеток, вовлеченных в презентирование антигена на поверхности клеток (рисунок, в).

При изучении экспрессии каспазы у животных с классической моделью хронической интоксикации в ткани печени обнаруживалась противоположная тенденция. На 30-е сутки определялись единичные каспазапозитивные клетки в области центральных вен. К 60-м суткам клетки, экспрессирующие каспазу, обнаруживались в середине долек, демонстрируя тенденцию к распространению в центр-портального направлении (рисунок, г). Завершением этого процесса явилось вовлечение подавляющего числа гепатоцитов в экспрессию каспазы к 90-м суткам хронической ЭИ.

При исследовании ткани печени у животных с гипертиреозом указанная тенденция сохранялась, будучи более выраженной. Это касалось накопления каспазы в клетках околоцентральных зон уже на 30-е сутки и прогрессирования данного процесса до перипортальных областей к 90-м суткам эксперимента (рисунок, е).

Экспрессия NOS-3 у животных с классической моделью к 30-м суткам эксперимента определялась в эндотелиоцитах портальных трактов и в синусоидах перипортальных областей. По мере увеличения срока эксперимента число экс-

прессирующих клеток возрастало. Определение преимущественного вектора вовлечения новых клеток также указало на порто-центральное направление (рисунок, б).

Аналогичная динамика прослеживалась и в группе животных с гипертиреозом. Различие состояло в более выраженной экспрессии и в большем числе клеток, верифицированных как NOS-положительные (рисунок, д).

Морфометрический анализ выявил достоверные различия между относительными площадями, занимаемыми иммунопозитивными структурами в ткани на разных сроках эксперимента в классической модели (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что при хронической ЭИ формирование патологии печени происходит за счет фибропластического, сосудистого и цитопатического компонентов. Неотъемлемой частью хронической ЭИ является гипертиреоидное состояние, характеризующееся повышенным содержанием в системном кровотоке всех гормонов щитовидной железы.

При хронической ЭИ определяется вовлечение микроциркуляторного русла как сосудистого компонента. Указанные изменения верифицируются по нарастающему уровню экспрессии эндотелиальной нитрооксидсинтазы. Тиреоидная модуляция проявляется резким увеличением экспрессии NOS-3. Дискуссионным остается вопрос о том, является ли повышенная экспрессия нитрооксидсинтазы ответной реакцией на повреждение, или это следствие непосредственного действия тиреоидных гормонов на эндотелий и причина микроциркуляторных нарушений.

Обязательным цитопатическим компонентом патологии печени является активация ФНО-зависимого пути апоптоза клеток. При сравнительном анализе тиреоидного влияния (на модели с гипертиреозом) обнаружено усиление этого механизма гибели клеток гормонами щитовидной

**Таблица 3.** Относительная площадь (%) иммунопозитивного материала у крыс при хронической ЭИ ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Срок эксперимента, сутки		
		30-е	60-е	90-е
Без гипертиреоза				
TRAIL	2.6±0.9	15.6±3.0*	12.7±3.9*	17.8±2.6*
NOS-3	6.1±1.3	12.5±5.8*	19.4±5.8*	17.6±7.5*
Каспаза-3	1.6±0.4	7.7±6.3*	21.7±1.5*	23.0±4.9*
На фоне гипертиреоза				
TRAIL	14.2±3.7	16.5±6.2	17.8±1.6*	18.8±2.4*
NOS-3	8.9±5.1	16.2±5.7	20.1±4.5*	22.3±7.7*
Каспаза-3	14.5±3.3	19.4±5.5	23.0±2.9*	24.1±4.3*

железы. При гистотопографическом анализе морфологической картины ФНО-зависимого апоптоза обнаружено, что действие ЭИ проявляется в повышении экспрессии TRAIL и NOS-3 в клетках печени в порто-центральной области. Указанный факт можно интерпретировать как индукцию программируемой гибели клеток в перипортальных областях, как наиболее близко расположенных к источнику ЭИ. В то же время накопление в клетках каспазы характеризуется первоначальным поражением околоцентральных областей.

Таким образом, можно говорить о непосредственном тиреоидном модулирующем эффекте на течение хронической ЭИ и формирование патологии печени. Данный модулирующий эффект

имеет скорее количественный характер, утяжеляя течение ЭИ и опосредованного ею повреждения тканей печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология. М., 2003.
2. Балушкина Н.Н., Северин С.Е. // Архив патол. 2001. Т. 63, № 1. С. 51-60.
3. Мишнев О.Д., Шеголев А.И., Лысова Н.Л., Тинькова И.О. Печень и почки при эндотоксинемии. М., 2003.
4. Новочадов В.В., Писарев В.Б. Эндотоксикоз: Моделирование и органопатология. Волгоград, 2005.
5. Zutphen L.F., Baumann V., Beynen A.C. Principles of laboratory animal science. Amsterdam, 1993.

Получено 22.08.08