

УДК 1.616.441-002:615.361.013.85.014.41

В.И. Чуйкова, Юрченко Т.И., Марченко Л.И., Говоруха Т.И., Решич Н.В., Ковалев А.С., Кондаков И.И., Шарлай Т.М., Жуликова Е.И., Строна В.И.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

РЕАКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ВВЕДЕНИЕ ЭМБРИОФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Исследовали морфологию щитовидной железы крыс-реципиентов на 3-и сутки после подкожного введения фрагментов криоконсервированной ксеногенной фетальной щитовидной железы, криоконсервированной аллогенной плаценты и их совместного введения при медикаментозном гипотиреозе. Установлено, что максимальной эффективностью обладает введение плацентарной ткани как при продолжающемся воздействии тиреостатика, так и при его отмене.

Ключевые слова: гипотиреоз, криоконсервирование, ксенотрансплантация, аллотрансплантация, щитовидная железа, плацента.

Одним из приоритетных направлений клеточной и тканевой терапии является изучение возможности применения плацентарной ткани при терапии заболеваний различного генеза. В экспериментальных и клинических исследованиях была показана нормализация липидного спектра, стабилизация иммунологических и гемодинамических показателей после подкожного введения фрагментов плацентарной ткани пациентам со стабильной стенокардией напряжения [16]; увеличение числа купферовских клеток и двуядерных гепатоцитов при остром асептическом воспалении [15]; снижение уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина, а, следовательно, и снижение потребности в инсулине у пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа [6]. Клиническое применение плаценты и хориона (ранняя плацента) показало выраженный иммуномодулирующий эффект [10, 12]. Подкожное введение фрагмента криоконсервированной плаценты успешно используют в клинической практике при лечении невынашивания беременности [3] и половой дисфункции [4, 8]. Однако остается открытым вопрос об эффективности применения плацентарной ткани при лечении патологий щитовидной железы.

Разнообразие терапевтических эффектов плаценты обусловлено, по всей видимости, разнообразием биологически активных веществ, синтезируемых в ней, что обусловлено функциями плаценты. В течение беременности плацента выполняет важнейшие физиологические функции, необходимые для нормального развития плода: формирует иммунологический барьер между матерью и плодом, осуществляет транспорт низкомолекулярных веществ, синтезирует широкий спектр гормонов, цитокинов и др. Плацента, синтезируя гормоны, играет роль железы внутренней секреции, причем гормональная активность плаценты в течение беременности увеличивается. В плаценте синтезируются семейства эндогенных пептидных антибиотиков, что обуславливает противовоспалительную функцию плаценты [21, 27, 29]. В течение всего срока существования плацента характеризуется широким спектром иммунологических реакций, которые обеспечивают одну из ключевых задач органа – осуществление иммунологического барьера [20, 22, 23, 30].

Нельзя также не отметить, что в плаценте содержатся прогениторные и стволовые клетки. Исследования показывают, что мезенхимальные клетки, выделенные как из плодовой, так и материнской части плаценты экспрессируют маркер мезенхимальных и эмбриональных стволовых клеток, а *in vitro* дифференцируются в адипоциты, хондроциты, нейроклетки, кардиомиоциты и др. и обладают функциональным потенциалом для поддержания кроветворения, иммуномодуляции и стимуляции репаративных процессов [24, 28, 31]. Мезенхимальные стволовые клетки плаценты по своим свойствам отличаются от мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани [11].

Целью работы было изучение возможности применения криоконсервированной плацентарной ткани при гипотиреозе как изолированно, так и в комбинации с фрагментами криоконсервированной фетальной щитовидной железы.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на 45 беспородных крысах самцах 4 месячного возраста. В качестве трансплантата использовали фрагмент фетальной щитовидной железы человека 18-22 недель гестации массой 150 мг и плаценту крыс массой 180 мг, полученную от беременных самок на 15 сутки беременности. Щитовидную железу и плаценту замораживали до -196°C с криопротектором ДМСО по программам, разработанным в ИПКиК НАНУ [5, 13]. Дисфункцию щитовидной железы вызывали путем введения животным с питьевой водой фармацевтического препарата «Мерказолил» (ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина, г. Харьков) в концентрации 500 мг действующего вещества (мерказолила) на 1 л воды в течение 2 месяцев [18, 19].

Животные были разделены на следующие экспериментальные группы: Интактные животные (4 мес.) (1); Моделирование гипотиреоза (2); Введение фрагментов криоконсервированной ксеногенной фетальной щитовидной железы (ККФЩЖ) при продолжающемся воздействии тиреостатика (3) и его отмене (4); Введение криоконсервированной аллогенной плаценты (КАП) при продолжающемся воздействии тиреостатика (5) и его

отмене (6); Сочетанное введение КАП и ККФЩЖ при продолжающемся воздействии тиреостатика (7) и его отмене (8); - Контроль (отмена тиреостатика без введения биологического материала) (9).

Биологический материал вводили под легким эфирным наркозом в подкожный карман в области холки. Животных выводили из эксперимента декапитацией на 3 сутки после введения биологического материала, контрольных животных выводили из эксперимента на 3 сутки после отмены тиреостатика. Все виды манипуляций над животными проводили в соответствии с этическими нормами III Национального конгресса по биоэтике. Фрагменты щитовидной железы (ЩЖ) фиксировали в формалине, подвергали стандартной гистологической проводке, полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином, образцы исследовали под световым микроскопом МБИ-15.

Результаты исследования и их обсуждение. Щитовидная железа интактных животных была представлена фолликулами различной формы (от округлых до вытянутых) (рис. 1а). В центре располагались фолликулы средних размеров, по периферии – крупные фолликулы, их контуры и просвет были хорошо различимы во всех зонах ЩЖ. Фолликулы были выстланы кубическим эпителием, клетки которого содержали округлые гиперхромные ядра. В фолликулах определялся бледно окрашенный коллоид с редкими вакуолями резорбции. Введение тиреостатика в течение 2-х месяцев приводило к деструктивным процессам в ткани щитовидной железы. Структура ткани щитовидной железы была неоднородной: в ее краевых участках определялись спавшиеся фолликулы малого размера. Некоторые фолликулы, выстланные уплощенным эпителием, содержали бледно окрашенный коллоид, отмечалась десквамация эпителия в полость фолликула. В центральной зоне - фолликулы не обнаруживались, ткань была однородной, представленной эпителием, вероятнее всего образовавшимся из разрушенных фолликулов; в самом центре железы наблюдался обширный участок тканевого детрита с отложениями гемосидерина (рис. 1б).

Морфологический анализ ЩЖ контрольной группы животных, т.е. после отмены тиреостатика без введения биологического материала, показал частичное восстановление гистоструктуры органа. Наблюдалось большое количество гигантских фолликулов, расположенных как на периферии, так и в центральной части органа (рис. 1в). Средние и мелкие фолликулы были выстланы главным образом кубическим эпителием. Микрофрагменты тканевого детрита в этой группе животных были выражены сильнее, чем в группах с введением биологического материала. Все фолликулы содержали бледно окрашенный коллоид без вакуолей резорбции.

При введении щитовидной железы и продолжающемся воздействии тиреостатика структура органа была мозаичной, определялось большое количество гигантских фолликулов, выстланных в основном уплощенным эпителием, которые перемежались со средними и мелкими фолликулами, выстланными высоким кубическим эпителием (рис. 1г). Все фолликулы были заполнены бледно окрашенным коллоидом. Наблюдалась единичная десквамация эпителия в полость фолликулов. По всему срезу определялись микроучастки тканевого детрита. При сочетанном введении биоматериала и продолжающемся воздействии тиреостатика полиморфизм в размере фолликулов был менее выражен (рис. 1з). Большие фолликулы в основном были выстланы низким кубическим эпителием, а средние и мелкие – высоким, коллоид бледно окрашен. Наблюдалась единичная десквамация эпителия. Также определялись небольшие участки тканевого детрита. Наличие гигантских фолликулов нами не отмечено. Во всей ткани железы отмечалось полнокровие сосудов. Введение плаценты при продолжающемся воздействии тиреостатика сопровождалось наиболее выраженным восстановлением гистоструктуры органа: ткань щитовидной железы была представлена средними и мелкими фолликулами, которые содержали коллоид. По всему срезу наблюдалось образование новых фолликулов как путем деления уже существующих, так и их образование из интерфолликулярного эпителия (рис. 1е). Фолликулы с интенсивно окрашенным коллоидом были выстланы плоским эпителием, фолликулы со слабо окрашенным коллоидом – кубическим, при этом гигантские фолликулы и клеточный детрит отсутствовали.

Аналогичную тенденцию мы наблюдали и у животных, которым вводили биологический материал при отмене тиреостатика, а именно, при введении щитовидной железы структура исследуемого органа была представлена крупными, средними и мелкими фолликулами (рис. 1д). Частично наблюдалась мозаичность структуры, но в целом крупные фолликулы располагались по периферии органа, средние и мелкие – в центральной части. Все фолликулы были выстланы кубическим эпителием и содержали коллоид, в некоторых из них отмечалась десквамация единичных тироцитов.

Более выраженное восстановление гистоструктуры щитовидной железы наблюдалось с введением ККФЩЖ+КАП при отмене тиреостатика (рис. 1и), где строение щитовидной железы в целом соответствовало интактному, хотя и преобладали крупные фолликулы. Гигантские фолликулы отсутствовали. Большинство фолликулов было выстлано высоким кубическим эпителием и заполнено интенсивно окрашенным коллоидом плотной консистенции. Вакуоли резорбции отсутствовали. Наиболее интенсивное восстановление органа отмечено при введении плаценты и отмене тиреостатика и в этом случае структура щитовидной железы соответствовала интактной (рис. 1ж): по всему срезу преобладали мелкие и средние фолликулы, выстланные кубическим эпителием и заполненные коллоидом. Наблюдалось интенсивное формирование новых фолликулов как путем деления уже образованных, так и из межфолликулярного эпителия.

Мерказолил тормозит первый этап биосинтеза гормонов щитовидной железы – включение окисленного йода в остатки тирозина. К другим эффектам мерказолила относятся нарушение синтеза тиреоглобулина и изменение его структуры, торможение конденсации остатков йодтирозинов в йодтиронины [9], стимуляция

пролиферации интерфолликулярного эпителия, нарушение гемоциркуляции [14], струмогенный эффект [1]. В нашем эксперименте введение тиреостатика мерказолил в течение 2-х месяцев вызывало деструктивные процессы в щитовидной железе. Учитывая вышеописанные эффекты мерказолила, можно предположить, что увеличение размеров щитовидной железы связано со струмогенным эффектом препарата и стимуляцией пролиферации интерфолликулярного эпителия, а обширный участок тканевого детрита, вероятно, образовался вследствие нарушения гемоциркуляции.

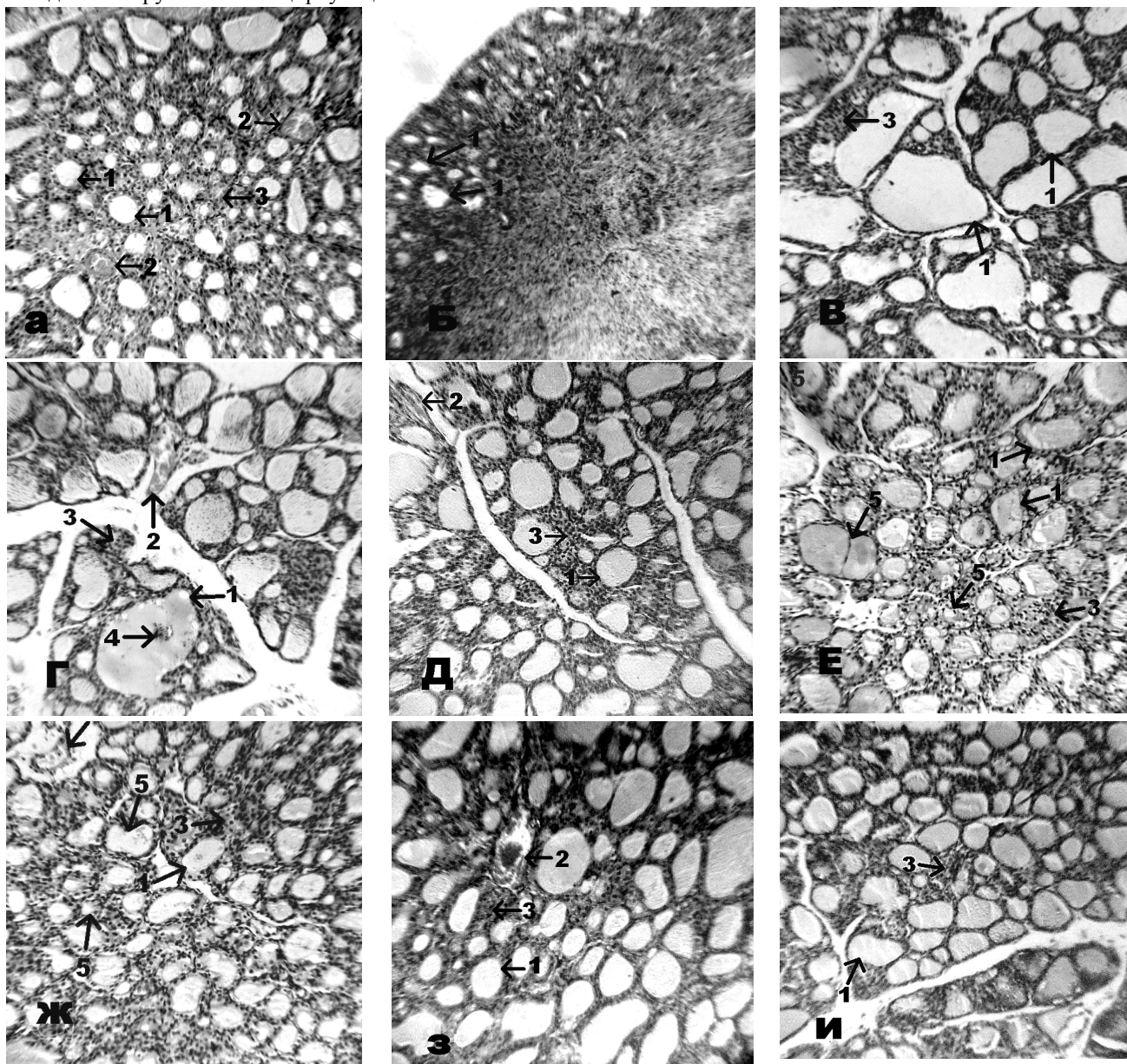


Рисунок 1 Щитовидная железа intactных животных (а), после 2-х месяцев приема тиреостатика (б) и на 3 сутки эксперимента: отмена тиреостатика (контроль) (в), введения ККФЦЖ на фоне воздействия тиреостатика (г) и его отмене (д), введения КАП на фоне воздействия тиреостатика (е) и его отмене (ж), введения ККФЦЖ+КАП на фоне воздействия тиреостатика (з) и его отмене (и). Окр. Г. – э. ок. 12, об. 16. 1 – фолликулы; 2 – сосуды; 3 – экстрафолликулярный эпителий; 4 – десквамация эпителия в фолликул; 5 – образование новых фолликулов.

Частичное восстановление гистоструктуры щитовидной железы наблюдалось уже на 3-и сутки у контрольных животных и после введения биологического материала как при продолжающемся воздействии тиреостатика, так и при его отмене, что согласуется с данными литературы, поскольку известно, что новые фолликулы могут достаточно быстро образовываться из интерфолликулярного эпителия или путем деления уже существующих фолликулов [2]. При этом наименее выраженное восстановление наблюдалось у контрольных животных (отмена тиреостатика без введения биологического материала) и при введении щитовидной железы как при продолжающемся воздействии тиреостатика, так и при его отмене. Наиболее выраженное восстановление наблюдалось при введении плаценты, причем в обоих вариантах ее введения (при продолжающемся воздействии тиреостатика и его отмене) структура щитовидной железы соответствовала intactной. При комбинированном введении биоматериала морфология щитовидной железы занимала промежуточное положение между ее структурой при введении ККФЦЖ и при введении плаценты. Таким

образом, мы не наблюдали потенцированного действия обоих трансплантатов, а наоборот, более выраженное воздействие плацентарной ткани частично нивелировалось действием введенной щитовидной железы.

Как уже было отмечено выше, плацентарная ткань содержит большое количество биологически активных веществ, для многих из которых уже установлено стимулирующее действие на ткань щитовидной железы. Таким образом, можно предположить, что именно этим и объясняется более выраженное восстановление структуры щитовидной железы реципиентов после токсического повреждения мерказолилом. К числу таких биологически активных веществ относятся некоторые гормоны, в том числе и эстрадиол. Установлено, что на тиреоцитах присутствуют эстрогеновые рецепторы [17, 26], а исследования показывают корреляцию между гиперэстрогенией и повышенной функциональной активностью щитовидной железы [30]. Кроме того, содержащиеся в плаценте факторы роста (инсулиноподобный фактор роста, эпидермальный фактор роста, сосудистый эндотелиальный фактор роста и др.) также могут оказывать влияние на ткань щитовидной железы, стимулируя ее репаративные возможности [7, 25].

Выводы

Введение криоконсервированной аллогенной плаценты способствует практически полному восстановлению структуры органа даже в условиях продолжающегося воздействия тиреостатика уже на 3 сутки после введения, что свидетельствует о высоком потенциале применения плацентарной ткани в терапии дисфункции щитовидной железы, что связано с высоким содержанием в ней биологически активных веществ со специфическим и неспецифическим характером их действия, что может объяснять ускоренную регенерацию тиреоидной ткани.

Литература

1. Айвазова А.С. Изучение тиреотропных свойств зюзника европейского (*Lycopus europaeus* L.): автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 14.00.25 «фармакология, клиническая фармакология» / А.С. Айвазова. – Москва, 2008. – 22 с.
2. Быков В.Л. Частная гистология: учебник / Владимир Лазаревич Быков. – С.-Пб.: СОТИС, 1999. – 300 с.
3. Грищенко В.И. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в лечении невынашивания беременности / В.И. Грищенко, В.В. Лазуренко, О.С. Прокопюк // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С. 76 – 80.
4. Грищенко В.И. Трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин / В.И. Грищенко, А.Г. Геродес, Е.К. Алипова // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С.91 – 92.
5. Грищенко В.І. Заготівля, криоконсервування плацентарної тканини та їх клінічне застосування / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, І.Ю. Кузьміна // – Київ. – 1996. – 10 с.
6. Дворник І.Л. Вивчення терапевтичної дії криоконсервованої фетоплацентарної тканини в комплексній терапії цукрового діабету 1 та 2 типів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец 14.01.14 «ендокринологія» / І.Л. Дворник. – Харків, 2004. – 20с.
7. Кузнецова И.А. Состояние щитовидной железы у женщин с множественными гиперпластическими процессами органов репродуктивной системы / И.А. Кузнецова // Вестник С.-Пб. университета. – 2009. - №3. – С. 198 – 203.
8. Луценко Н.С. Применение гетеротопической трансплантации криоконсервированной ткани плаценты в комплексном лечении женщин с дисфункцией нервной системы на фоне гипозэстрогении / Н.С. Луценко, А.В. Грицай, В.Г. Карпенко // Проблемы криобиологии. – 2004. – №3. – С. 86 – 92.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. Т. 2 / Михаил Давыдович Машковский. – М.: ООО «Новая волна», 2002. – 608 с.
10. Мелешенко И.Н. Опыт применения клеточно-тканевой терапии в практике аллерголого-иммунологического центра / И.Н. Мелешенко, Л.Л. Терещенко, Т.Н. Кузюбердина // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 31.
11. Петровский Я.Л. Сравнительная характеристика мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, жировой ткани и плаценты человека: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 14.00.36 «аллергология и иммунология» / Я.Л. Петровский. – Новосибирск, 2009. – 19 с.
12. Питько В.А. Влияние криоэкстракта хориона на состояние иммунитета женщин с подострым сальпингоофоритом / В.А. Питько, В.И. Грищенко, Н.П. Суббота // Проблемы криобиологии.–2000.–№1.–С. 76 – 81.
13. Чуйко В.А. и др. Трансплантация криоконсервированной щитовидной железы как метод лечения гипотиреоза / В.А. Чуйко, В.И. Грищенко, А.М. Утевский //Метод. рекомендации. - Харьков. - 1986. - 6 с.
14. Шадлинский В.Б. Влияние мерказолила на структуру фолликулов щитовидной железы крыс / В.Б. Шадлинский // Бюлетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т.127, №4. – С. 473 – 476.
15. Шепітько В.І. Структурно-функціональні показники криоконсервованої плаценти і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук: спец. 14.01.35 «кріомедицина» / В.І. Шепітько. – Харків, 2004. – 40 с.
16. Шепітько К.В. Вплив криоконсервованої фетоплацентарної тканини на перебіг стабільної стенокардії напруги: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец 14.01.11 «кардіологія» / К.В. Шепітько. – Харків, 2004. – 24 с.

17. Banu K.S. Testosterone and estradiol up-regulate androgen and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands in vivo / K.S. Banu, P. Govindarajulu, M.M. Aruldas // *Steroids*. 2002. Vol. 67. № 13–14. P. 1007–1014.
18. Brain and pituitary receptors for thyrotropin-releasing hormone in hypothyroid rats / H.N. Bhargava, P. Ramarao, A. Gulati [et al.] // *Pharmacology*. – 1989. – Vol. 38, № 4. – P. 243–52.
19. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases / A.C. Bianco, D. Salvatore, B. Gereben [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2002. – V.23, №1. – P. 38–89.
20. Blaschitz A. HLA Class I protein expression in the human placenta / A. Blaschitz, H. Hutter, G. Dohr // *Early Pregnancy*. – 2001. – № 1. – P. 67 – 69.
21. Buhimschi I.A. The novel antimicrobial peptide β 3-defensin is produced by the amnion: A possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity / I.A. Buhimschi, M. Jabr, C.S. Buhimschi // *Am. J. of Obstetrics & Gynecology*. – 2004. – Vol. 191, № 5. – P. 1678 – 1687.
22. Carosella E.D. Immunotolerant function of HLA-G / E.D. Carosella // *CMLS*. – 1999. – Vol. 55, №3. – P. 327 – 333.
23. Djian V. Immunoactive products of placenta. V. Immunoregulatory properties of a low molecular weight compound obtained from human placental cultures / V. Djian, E. Menu, G. Thibault // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1996. – Vol. 36, №1. – P. 11 – 24.
24. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential / Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D. [et al.] // *Stem Cells*. – 2004. – Vol. 22. – P. 649 – 658.
25. Hoffmann S. Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors / S. Hoffmann, L.C. Hofbauer, E. Scharrenbach [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2004. - Vol. 89. - P. 6139 –6145.
26. Lewy-Trenda I. Estrogen and progesterone receptors in neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions / I. Lewy-Trenda // *Pol. J. Pathol.* - 2002. - V. 53., № 2. - P. 67 – 72.
27. Oullette A.J. Purification and primary structure of mouse cryptdin-1, a Panrth cell defensin / A.J. Oullette, S.I. Miller // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 304, №2 – 3. – P. 146 – 148.
28. Parolini O. Human Placenta: a Source of Progenitor/Stem Cells? / Ornella Parolini, Maddalena Soncini // *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* – 2006. – Vol.3, №2. – P. 117 – 126.
29. Pasca A.M. The placenta: the lost neuroendocrine organ / Anca M. Pasca, Anna A. Penn // *NeoReviews*. – 2010. - Vol.11, №.2. – P. 64 – 77.
30. Roth I. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10 / I. Roth, D.B. Corry, R.M. Locksley // *JEM*. – 1996. – Vol. 184, № 2. – P. 539 – 548.
31. Zhang X. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering / Zhang X., Mitsuru A., Igura K. // *Biochem. Biophys. Res Commun.* – 2006. – Vol. 340. – P. 944 – 952.

Резюме

**РЕАКЦІЯ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ НА
ВВЕДЕННЯ ЕМБРІОФЕТОПЛАЦЕНТАРНИХ
ТКАНИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
ГІПОТИРЕОЗІ**

**Чуйкова В.І., Юрченко Т.М., Марченко Л.Б.,
Говоруха Т.П., Репін М.В., Ковальов О.С.,
Кондаков І.І., Шарлай Т., Жулікова О., Строна В.І.**

Досліджували морфологію щитоподібної залози шурів-реципієнтів на 3-ю добу після підшкірного введення фрагментів кріоконсервованої ксеногенної фетальної щитовидної залози, кріоконсервованої алогенної плаценти і їх спільного введення при медикаментозному гіпотиреозі. Встановлено, що максимальною ефективністю володіє введення плацентарної тканини як при дії тиреостатика, так і при його відміні.

Ключові слова: гіпотиреоз, кріоконсервування, ксенотрансплантація, алотрансплантація, щитовидна залоза, плацента.

Стаття надійшла 11.11.2011 р.

**RESPONSE OF THYROID GLAND ON
INTRODUCTION OF FETOPLACENTAL TISSUES
IN EXPERIMENTAL HYPOTHYREOSIS**

**Chuykova V.I., Yurchenko T.N., Marchenko L.N.,
Govorukha T.P., Repin N.V., Kovaleb A.S., Kondakov
I.I., Sharlay T., Zhulikova E., Strona V.I.**

There was studied the morphological characteristics of recipient's rat's thyroid gland to the 3rd day after subcutaneous introduction of cryopreserved xenogenous fetal thyroid gland, cryopreserved allogeneic placenta and their joint introduction in medicinal hypotheriosis. It has been established that the introduction of placental tissue is of maximum efficiency both during continuing effect of thyreostatics and during their absence.

Key words: hypotheriosis, cryopreservation, xenotransplantation, allotransplantation, thyroid gland, placenta.