

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДИФFUЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ЗОБА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У САМЦОВ КРЫС

*А.Х. Каде, С.А. Занин, И.Ю. Вавринюк, Д.А. Губайдуллин, А.И. Трофименко*

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Актуальной задачей современной эндокринологии является поиск новых высокоэффективных и безопасных методов лечения диффузного токсического зоба, что требует разработки новых, пригодных для рутинного применения, моделей болезни Грейвса у животных. С этой целью была разработана модель диффузного токсического зоба в эксперименте у самцов крыс. Проводилась иммунизация смесью липидной фракции гомогената свиной щитовидной железы, полного адьюванта Фрейнда и додецилсульфата натрия в дозировке 4 мл на 1 кг веса тела трехмесячным самцам крыс по схеме на 1, 10, 18-е сутки. К 21-м суткам эксперимента появлялись гистологические признаки гиперфункции щитовидной железы, а также статистически достоверное увеличение в сыворотке крови содержания Т4 в 3,2 раза, падение уровня ТТГ в 2,4 раза, а также снижение содержания Т3 в 4,4 раза. По итогам проведенного гистологического исследования щитовидной железы и оценки результатов лабораторных анализов сделан вывод о развитии у опытной группы крыс аутоиммунной тиреопатии с гипертиреозом.

*Ключевые слова:* диффузный токсический зоб, щитовидная железа, крыса.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-3(71)-99-101

## THE DESIGN OF GRAVE'S DISEASE MODEL IN EXPERIMENT ON MALE RATS

*A.H. Kade, S.A. Zanin, I.Ju. Vavrinjuk, D.A. Gubajdullin, A.I. Trofimenko*

*FSBEI HE «Kuban State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation*

The actual topic of modern endocrinology is the search for new highly effective and safe methods for treating diffuse toxic goiter, which requires the development of new models of Graves' disease suitable for routine using on animals. The goal of this work was to develop models of diffuse toxic goiter in an experiment on male rats. We showed that the immunization with a mixture of the lipid fraction of homogenate the porcine thyroid gland with complete Freund's adjuvant and sodium dodecyl sulfate in a dosage of 4 ml per 1 kg of body weight in three-month-old male rats according to the scheme on 1, 10, 18 days is accompanied to the 21<sup>st</sup> day by the appearance of histological signs of hyperthyroidism, as well as a statistically significant increase in serum of T4 concentration by 3,2 times, a drop in TSH concentration by 2,4 times and a decrease in T3 concentration by 4,4 times. Thus, according to the results of the histological examination of the thyroid gland and evaluation of the results of laboratory analyzes, we made a conclusion of the development autoimmune thyreopathy in hypertireosis in an experimental group of rats.

*Key words:* Grave's disease, thyroid gland, rat.

Диффузный токсический зоб (ДТЗ), или болезнь Грейвса – это мультифакториальное хроническое аутоиммунное заболевание, при котором аутоантитела стимулируют рецепторы тироцитов к ТТГ (тиреотропный гормон), что вызывает гиперпродукцию тиреоидных гормонов, приводит к увеличению размеров щитовидной железы (ЩЖ) с формированием зоба и сопровождается клиническими проявлениями гипертиреоза [5].

В регионах, не испытывающих дефицита по йоду, ДТЗ выявляется у 70–80 % пациентов с гипертиреозом. По данным клиники Майо (США), заболеваемость ДТЗ составляет: у женщин 36,8 случаев, а у мужчин 8,3 случая на 100 тыс. населения в год [2]. При этом соотношение между заболевшими женщинами и мужчинами в разных регионах колеблется от 4:1 до 10:1 [2].

Важность проблемы ДТЗ заключается в том, что до настоящего времени нет достаточно безопасных и в то же время высокоэффективных методов его патогенетической терапии, усилия врачей направлены преимущественно на коррекцию уровня тиреоидных гормонов. При этом применение

радиоактивного йода, анти тиреоидных препаратов и различные оперативные вмешательства на ЩЖ не гарантируют выздоровления и зачастую осложняются развитием серьезных побочных эффектов [2].

В настоящее время существуют следующие направления в моделировании ДТЗ у животных: иммунизация с использованием ТТГ и адьюванта; использование моноклональных антител к рецептору ТТГ; введение животным клеток с повышенной экспрессией ТТГ; использование аденовирусов и плазмид, индуцирующих экспрессию ТТГ; трансплантация графтов человеческой ЩЖ иммунодефицитным SCID мышам с последующим введением человеческих аутоантител к рецептору ТТГ и лимфоцитов от пациентов с болезнью Грейвса; зачастую, в дополнение к основной модели, животные переводятся на рацион обогащенный йодом [4].

Несмотря на то, что при создании некоторых из перечисленных моделей развивается выработка антител к рецептору ТТГ и гипертироксинемия, ни одна из них не способна в полной мере воспроизвести у животного основные аспекты патогенеза ДТЗ. Большинство моделей ДТЗ, ввиду дороговизны

и сложности, не пригодны для массового использования. При этом использование самок животных диктует необходимость учитывать в ходе исследования фазы менструального цикла, что существенно усложняет дизайн исследования. Поэтому особую важность приобретает разработка дешевой модели ДТЗ, пригодной для рутинного применения.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Создание модели диффузного токсического зоба в эксперименте у самцов крыс.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 40 белых нелинейных трехмесячных самцах крыс средней массой ( $125 \pm 7$ ) г. Животные взяты из не эндемичной по дефициту йода зоны и получали стандартный рацион. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of the Laboratory Animf».

Характеристика групп животных: группа № 1 (сравнения,  $n = 20$ ) – крысам вводили полный адьювант Фрейнда; группа № 2 (опытная,  $n = 20$ ) – крысам вводили эмульсию на основе гомогената щитовидной железы свиньи и полного адьюванта Фрейнда. Распределение крыс между группами проводилось с помощью таблицы случайных чисел.

Моделирование ДТЗ проводили путем подкожного введения иммуногена в дозе 4 мл на 1 кг веса тела в подлопаточную область на 1, 10, 18 сутки эксперимента. Для получения иммуногена готовили смесь гомогената щитовидной железы свиньи и полного адьюванта Фрейнда (Calbiochem) в пропорции 1:1. Полученную смесь выдерживали в холодильнике при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение суток, затем отбирали липидную фракцию. Непосредственно перед применением смешивали липидную фракцию с 0,9%-м раствором хлорида натрия в пропорции 1:1, затем добавляли 1%-й (по массе) раствор додецилсульфата натрия (Вектон, Россия) из расчета 10 мкл на 1 мл смеси, встряхивали в вортексе до получения эмульсии, которую использовали для иммунизации.

Эвтаназию выполняли на 21-е сутки от начала эксперимента после внутримышечного введения телазола («Zoetis Inc», Испания) 3 мг/кг и ксиланита (ООО «Нита-Фарм», Россия) 4 мг/кг и достижения состояния наркоза, у крыс путем пункции сердца выполняли забор 3 мл крови, затем проводили декапитацию. Комплекс трахея и ЩЖ, сразу после выделения, помещали в цинк-формалиновый фиксатор с сульфатом цинка [3]. Выполняли проводку образцов через изопропанол, с последующей заливкой в парафин. Парафиновые блоки нарезали на срезы толщиной 5 мкм на микротоме МПС-2 (СССР). Окрашивание микропрепаратов проводили гематоксилином и эозином. Для фотографии микропрепаратов использовали микроскоп Микмед-5 (Россия) и окулярную камеру Levenhuk-230 (США).

Определение содержания гормонов (ТТГ, Т3 и Т4) в сыворотке крови выполняли по методу ELISA на модульном иммунохимическом анализаторе Architect i2000SR (Abbott) с использованием следующих тест-систем: Thyroid Stimulating Hormone (TSH) ELISA Kit (Cusabio), T3 ELISA Kit (Abnova), Thyroxine ELISA Kit (Cusabio).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «Statistica 10 version» фирмы «Stat Soft Inc.» (США). Полученные результаты выражали в виде медианы и квартилей, в виде Me (Q1-Q3). Для проверки гипотезы о нормальном распределении признаков использовали критерий Шапиро – Уилка. В связи с тем, что распределение значений исследуемых показателей отличалось от нормального, проверка нулевой гипотезы об отсутствии различий проводилась по критерию Манна – Уитни (U-test), с установлением критического уровня значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При макроскопическом исследовании ЩЖ у крыс из опытной группы отмечается незначительное увеличение ее размера, в остальном отличия от группы сравнения отсутствуют.

При исследовании микропрепаратов ЩЖ крыс из группы сравнения видно, что целостная структура железы сохранна, отчетливо выявляются фолликулы, разделенные тонкими соединительнотканными перегородками, в их составе видны сосуды, просвет которых заполнен эритроцитами. Размер фолликулов щитовидной железы варьирующ, их форма варьирует от круглой до неправильно овоидной. В полости фолликулов видно гомогенное, бледно-окрашенное эозинофильное вещество (коллоид), содержащее на периферии единичные неокрашенные вакуоли. Между фолликулами отчетливо видны скопления клеток интерфолликулярного эпителия. Стенка центральных фолликулов представлена слоем клеток кубической формы с закругленными ядрами. Фолликулы на периферии железы выстланы слоем уплощенных клеток однослойного кубического эпителия. В некоторых фолликулах видны единичные, расположенные между базальной мембраной и тироцитами, клетки с большими, бледно-окрашенными ядрами (С-клетки) (рис. 1).

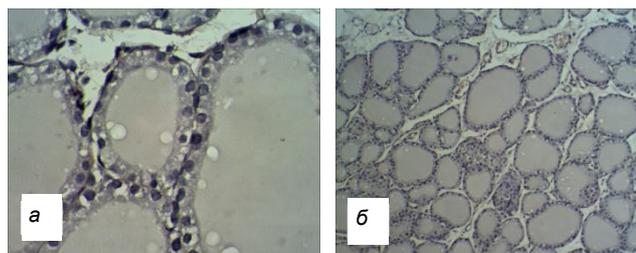


Рис. 1. Щитовидная железа крысы из группы № 1 (сравнения). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 100 крат (а) и 400 крат (б)

При исследовании микропрепаратов ЩЖ крыс из опытной группы обнаружены признаки умеренной деградации общей архитектоники железы и дезорганизации структуры ее фолликулов, на фоне увеличения количества интерфолликулярных клеток. Выявляется умеренное количество фолликулов с поврежденной стенкой. Сосуды, расположенные в пространствах между фолликулами, видны слабо, в их просвете содержится мало эритроцитов. В пространстве между фолликулами видны признаки умеренной воспалительной клеточной инфильтрации, прослеживаются единичные клетки с подковообразным ядром (нейтрофилы), при этом признаков выраженной лимфоцитарной инфильтрации не выявлено. Некоторые фолликулярные клетки имеют гиперхромизированные ядра. В просвете единичных фолликулов видны спущенные клетки фолликулярного эпителия. Эпителий в большинстве фолликулов имеет кубовидную, в некоторых столбчатую форму, что свидетельствует о высокой функциональной активности железы. Наблюдается увеличение количества и размера вакуолей в коллоиде большинства фолликулов, что свидетельствует о гиперфункции ЩЖ. Единичные фолликулы имеют яркую эозинофильную окраску коллоида (рис. 2). В целом, в сопоставлении с группой сравнения, коллоид имеет более насыщенную окраску. Схожие изменения, по данным литературы, наблюдаются при модели ДТЗ, индуцированной введением ТТГ-аденовирусного вектора [4].

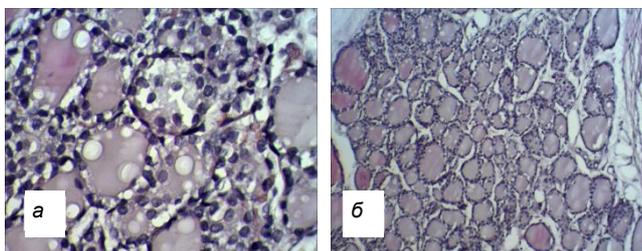


Рис. 2. Щитовидная железа крысы из опытной группы. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 100 крат (а) и 400 крат (б)

При исследовании сыворотки крови крыс, на 21-е сутки от начала эксперимента, у животных из группы сравнения концентрация ТТГ, сТ3 и сТ4 находится в пределах значений физиологической нормы у крыс [1], результаты представлены в табл.

Содержание ТТГ, Т3 и Т4 в сыворотке крови крыс на 21-е сутки от начала эксперимента

Me (Q1-Q3)	Группа № 1 (сравнения)	Группа № 2 (опытная)
ТТГ, мкМЕ/мл	1,72 (0,85–2,8)	0,7 (0,6–0,89)
сТ3, нг/мл	2,8 (1,86–3,1)	0,64 (0,6–0,72)
сТ4, нг/мл	12,1 (9,2–13,9)	39 (27,5–42,2)

При исследовании сыворотки крови крыс, на 21-е сутки от начала эксперимента, у животных из опытной группы наблюдается увеличение уровня сТ4 в 3,2 раза ( $p \leq 0,05$ ), что является признаком гипертиреоза. При этом имеет место падение содержания ТТГ в 2,4 раза ( $p \leq 0,05$ ). Это свидетельствует об угнетении продукции ТТГ в организме крыс из опытной группы и является одним из признаков ДТЗ. Исследование уровня сТ3 у крыс из опытной группы показывает падение его концентрации в 4,4 раза ( $p \leq 0,05$ ), в сравнении с группой 1. Падение уровня сТ3 свидетельствует о значительном угнетении дейодирования Т4 в периферических тканях, что является компенсаторной реакцией на гипертироксинемию [4, 5]. По данным литературы, падение уровня Т3 в организме животных при моделировании болезни Грейвса описывается как один из существенных недостатков моделей ДТЗ у животных [4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение иммунизации смесью липидной фракции гомогената свиной ЩЖ, полного адьюванта Фрейнда и додецилсульфата натрия в дозировке 4 мл на 1 кг веса тела у трехмесячных самцов крыс по схеме на 1, 10, 18-е сутки к 21-м суткам эксперимента сопровождается появлением гистологических признаков гиперфункции ЩЖ, а также статистически значимым увеличением содержания в сыворотке крови Т4 в 3,2 раза, падением концентрации ТТГ в 2,4 раза и снижением уровня Т3 в 4,4 раза. Таким образом, итоги проведенного гистологического изучения ЩЖ и оценка результатов лабораторных анализов позволяют сделать вывод о развитии аутоиммунной тиреопатии с гипертиреозом у крыс из опытной группы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Glattre E., Eybl V., Kotyzova D., Mihajlevic M., Pikner R., Topolcan O. Blood serum level of TSH and thyroid hormones and thyroid tissue content of iodine in rats under restricted selenium and iodine supply // *Norsk Epidemiologi.* – 2001. – № 2 (11). – P. 201–204.
2. Hammerstad S.S., Tomer Y. Epidemiology and genetic factors in Graves' disease and Graves' ophthalmopathy // *Graves' Disease.* – Springer, New York, 2015. – P. 21–37.
3. Kierman J.A. Histological and histochemical methods. Theory and practice. – London: Scion Publishing Ltd., 2008. – 606 p.
4. McLachlan S.M., Nagayama Y., Rapoport B. Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models // *Endocrine reviews.* – 2005. – № 6 (26). – P. 800–832.
5. Weetman A.P. *Thyroid disease* // *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition).* – 2014. – P. 557–574.

### Контактная информация

**Трофименко Артем Иванович** – к. м. н., ассистент кафедры общей и клинической патологической физиологии, Кубанский государственный медицинский университет, e-mail: artemtrofimenko@mail.ru