

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.441-008.64: 616.981.48

©Яглова, Березов

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ГИПОФИЗА

Н.В. Яглова^{1*}, Т.Т. Березов^{2,3}

¹Учреждение РАМН Научно-исследовательский институт морфологии человека
РАМН, ул. Цюрупы, д. 3, 117418, Москва; тел./факс: 8-499-120-80-65;
эл. почта: yaglova@mail.ru

²ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва

³Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Регуляторная роль бактериального липополисахарида, являющегося активатором толл-подобных рецепторов-4, в функционировании щитовидной железы связана со снижением синтеза тиреотропного гормона гипофизом и непосредственным воздействием на секреторную деятельность фолликулярных тироцитов. Эффекты активации толл-подобных рецепторов приводят к уменьшению продукции тироксина, но не подавляют активность дейодиназ, превращающих тироксин в трийодтиронин. Липополисахарид является частичным активатором и ингибитором различных фаз секреторного цикла фолликулярных тироцитов, приводя к накоплению тиреоглобулина в полости фолликулов. Последующая стимуляция секреторной деятельности щитовидной железы тиреотропным гормоном приводила к усилению резорбции тироцитами накопленного тиреоглобулина и увеличению продукции тиреоидных гормонов с выделением их в системный кровоток в основном в виде комплексов с транспортными белками в отличие от действия тиреотропного гормона, приводящего к повышению концентрации биологически доступных свободных форм гормонов.

Ключевые слова: липополисахарид, толл-подобные рецепторы-4, щитовидная железа, гипофиз, гормоны.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы в литературе опубликованы результаты работ, свидетельствующие о том, что функциональная активность щитовидной железы может регулироваться паттерн-распознающими рецепторами, в частности толл-подобными рецепторами. Установлено ингибирующее действие активаторов толл-подобных рецепторов-3 на экспрессию натрий-йодного симпортера, тиреопероксидазы и дейодиназ *in vitro* [1]. В ряде исследований *in vitro* была выявлена экспрессия тироцитами толл-подобных рецепторов-4 и комплекса адапторных белков MD2 и CD14 [2]. Активация этих рецепторов липополисахаридом (ЛПС) в присутствии ТТГ приводила к усилению захвата йода и экспрессии натрий-йодного симпортера, повышению экспрессии генов тиреоглобулина тироцитами под воздействием ЛПС в течение 72 часов [3]. С другой стороны, хорошо известным является также тот факт, что активация толл-подобных рецепторов-4 липополисахаридом *in vivo* вызывает активацию реакций врожденного иммунитета, развитие воспалительного процесса,

* - адресат для переписки

приводящего к уменьшению функциональной активности щитовидной железы, проявляющемуся понижением уровня тиреоидных гормонов в сыворотке крови, известному как синдром нетиреоидных заболеваний [4]. Основной причиной этого состояния ряд авторов считает снижение активности гипоталамо-гипофизарной системы [5]. В то же время нельзя не отметить, что ЛПС является постоянно циркулирующим в крови патоген-ассоциированным молекулярным паттерном: он является компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, входящих в состав микрофлоры кишечника многих видов млекопитающих животных и человека. В связи с вышесказанным, изучение влияния ЛПС на функциональную активность щитовидной железы представляет значительный интерес как с практической, так и теоретической точек зрения, по сути открывая новые аспекты регуляции функционирования эндокринных желез. Целью данного эксперимента был сравнительный анализ изменений функциональной активности щитовидной железы и тиреотропцитов гипофиза *in vivo*, возникающих после активации толл-подобных рецепторов-4 и рецепторов тиреотропного гормона (ТТГ), и при совместном воздействии ЛПС и ТТГ для установления регуляторной роли ЛПС в развитии изменений тиреоидного статуса организма.

МЕТОДИКА. Эксперимент выполнен на 105 самцах крыс Вистар массой тела 200-220 г в зимний период. Крыс рандомизировали на 3 опытные группы (группы Л, Т и ЛТ) и контрольную. Крысам группы Л вводили ЛПС *E. coli* штамм 026:B6 (Sigma, США) в дозе 10 мг/кг интраперитонеально. Крысам группы Т вводили бычий ТТГ (Sigma) в дозе 0,01 МЕ/кг массы тела интраперитонеально. Крысам группы ЛТ вводили ЛПС в дозе 10 мг/кг интраперитонеально, а через 24 ч - ТТГ в дозе 0,01 МЕ/кг массы тела интраперитонеально. Крысам контрольной группы интраперитонеально вводили аналогичный объем физиологического раствора. Животных групп Т и ЛТ выводили из эксперимента, вводя в/м 100 мг/кг золетила через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 часов после введения ТТГ. Крыс группы Л и контрольной выводили из эксперимента в эти же сроки одновременно с крысами групп Т и ЛТ. В сыворотке крови крыс методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию ТТГ, общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4), общего и свободного 3,5,3'-трийодтиронина (Т3 и сТ3) с помощью коммерческих наборов (Monobind, США). Исследуемые образцы сыворотки анализировали одновременно двукратно. Для изучения ультраструктуры фолликулярных тироцитов щитовидную железу фиксировали в 2,5% (объем/объем) растворе глutarового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,3) с постфиксацией в 1% (объем/объем) растворе OsO₄ в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,3) с последующей заливкой в смесь эпон-аралдит. Контрастирование срезов проводили 2,5% (масса/объем) водными растворами уранилацетата и цитрата свинца. Исследование срезов методом трансмиссионной электронной микроскопии проводили с использованием микроскопа "Libra 120" ("Carl Zeiss", Германия). Статистический анализ проводился с помощью параметрических и непараметрических методов, критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Изменения тиреоидного статуса крыс в эксперименте представлены на рисунке 1. Динамическое исследование тиреоидных гормонов у крыс группы Л показало, что воздействие ЛПС привело к снижению продукции ТТГ гипофизом, длившемся до 36 часов после введения ЛПС. Следствием этого стало снижение функциональной активности щитовидной железы, выражающееся в уменьшении содержания Т4 и сТ4. Через 36-48 часов после введения ЛПС концентрация ТТГ в сыворотке крови находилась в диапазоне контрольных значений, но это не вызывало повышения продукции как общего, так и свободного Т4, указывая на то, что снижение функциональной активности щитовидной железы обусловлено не только подавлением ТТГ, но и непосредственным воздействием ЛПС на щитовидную железу. Через 72 часа наблюдалось повышение содержания ТТГ, Т4 и сТ4 в сыворотке крови.

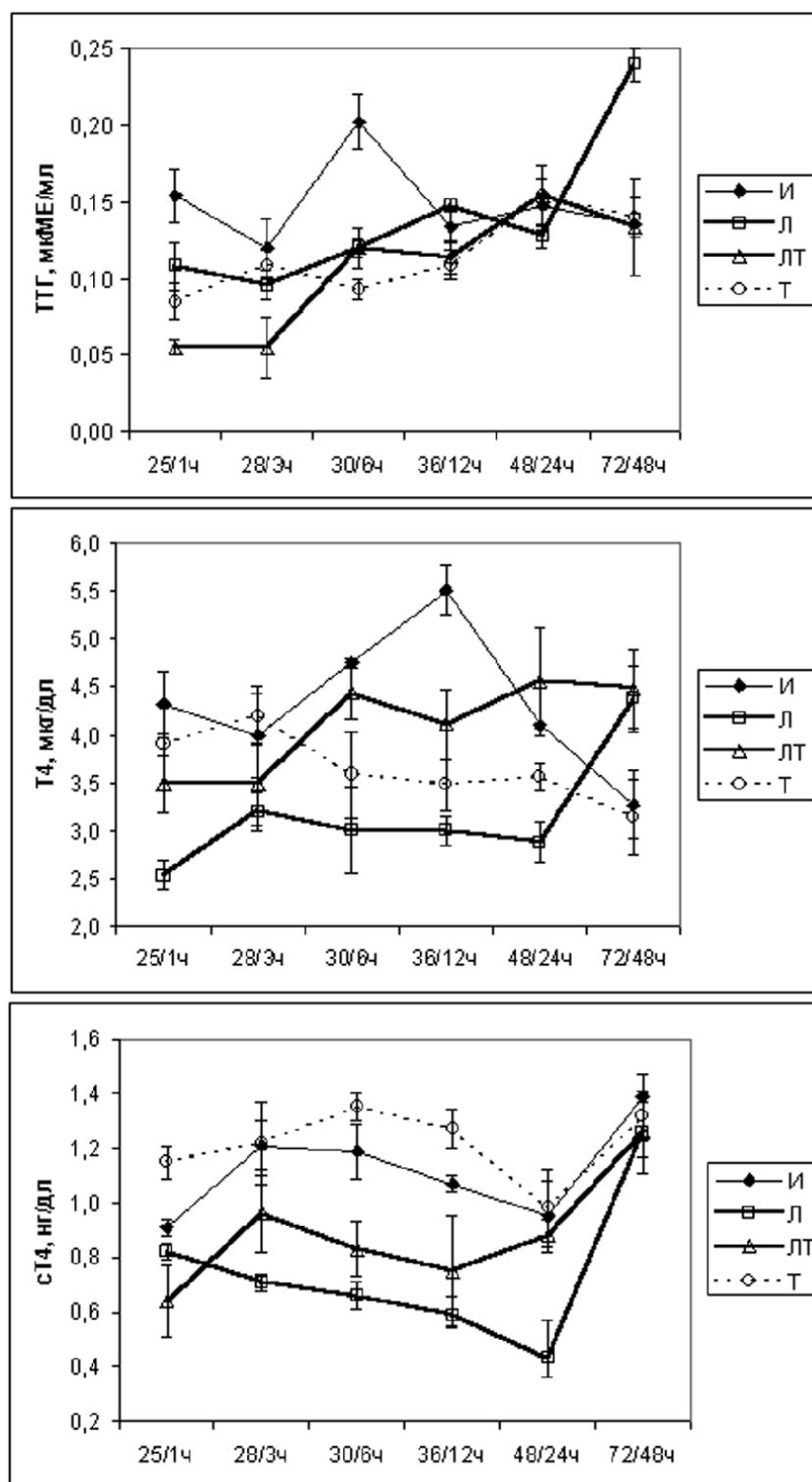


Рисунок 1.

Изменение концентрации тиреотропного гормона и гормонов щитовидной железы под воздействием ЛПС, ТТГ и ЛПС затем ТТГ.

Примечание: временные интервалы по оси абсцисс - количество часов после введения ЛПС/ количество часов после введения ТТГ.

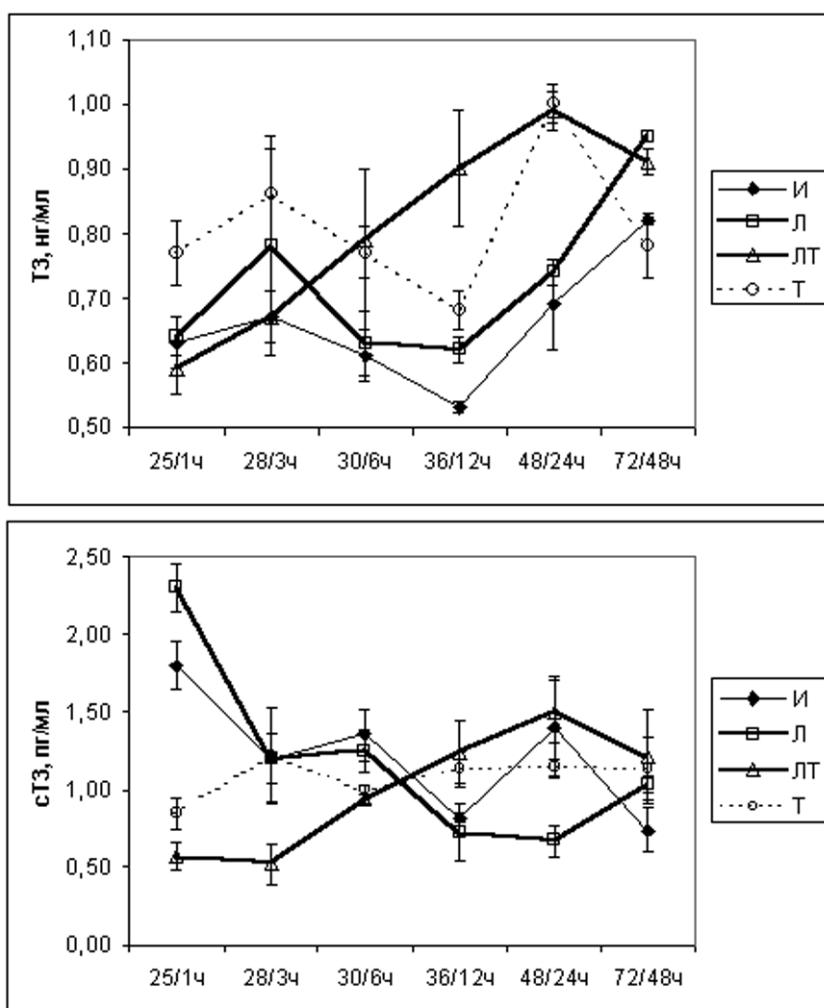


Рисунок 1. (продолжение)

Изменения тиреоидного статуса крыс группы ЛТ, выражающиеся в увеличении в сыворотке крови Т4 и сТ4, снижении в первые часы и последующем повышении Т3 и сТ3 свидетельствуют о чувствительности щитовидной железы к ТТГ при уже развившемся гипотиреозе. Наблюдавшиеся концентрации Т4 с 6-го по 48-й часы от введения ТТГ превышали значения группы Т, при том, что содержание ТТГ в сыворотке крови у крыс группы ЛТ с 12-го по 48-ой часы достоверно не отличалось от такового группы Т. Аналогичная картина наблюдалась по отношению к Т3 и сТ3. Это свидетельствует о развитии костимуляции щитовидной железы, индуцируемой ЛПС. Динамика ТТГ в сыворотке крови крыс группы Т - снижение по принципу обратной связи и постепенное повышение в течение 24 часов после введения ТТГ, была аналогичной в группе ЛТ. Аналогичные изменения отмечены и под воздействием ЛПС, с той лишь разницей, что через 72 часа после введения ЛПС наблюдался резкий подъем содержания ТТГ, и соответственно всех тиреоидных гормонов в сыворотке крови. Анализ полученных данных свидетельствует об ингибирующем действии ЛПС на центральное звено тиреоидной оси. Введение ТТГ здоровым крысам приводит к статистически значимому увеличению в сыворотке крови концентрации Т3 и сТ4, и снижению ТТГ по принципу обратной связи с последующим увеличением в течение 24 часов до контрольных значений.

Для установления морфофункциональных изменений щитовидной железы под воздействием ЛПС и ЛПС+ТТГ было проведено изучение ультраструктуры фолликулярных тироцитов. У крыс группы Л наблюдалось умеренное расширение канальцев гранулярной эндоплазматической сети, набухание матрикса митохондрий и деструкция их крист, появление большого количества лизосом в апикальных отделах тироцитов и единичные коллоидные капли в цитоплазме (рис. 2а). У крыс группы ЛТ выявлены выраженное расширение канальцев гранулярной эндоплазматической сети, набухание матрикса митохондрий, увеличение количества апикальных эндоцитозных везикул и значительное увеличение количества крупных коллоидных капель в цитоплазме (рис. 2б).

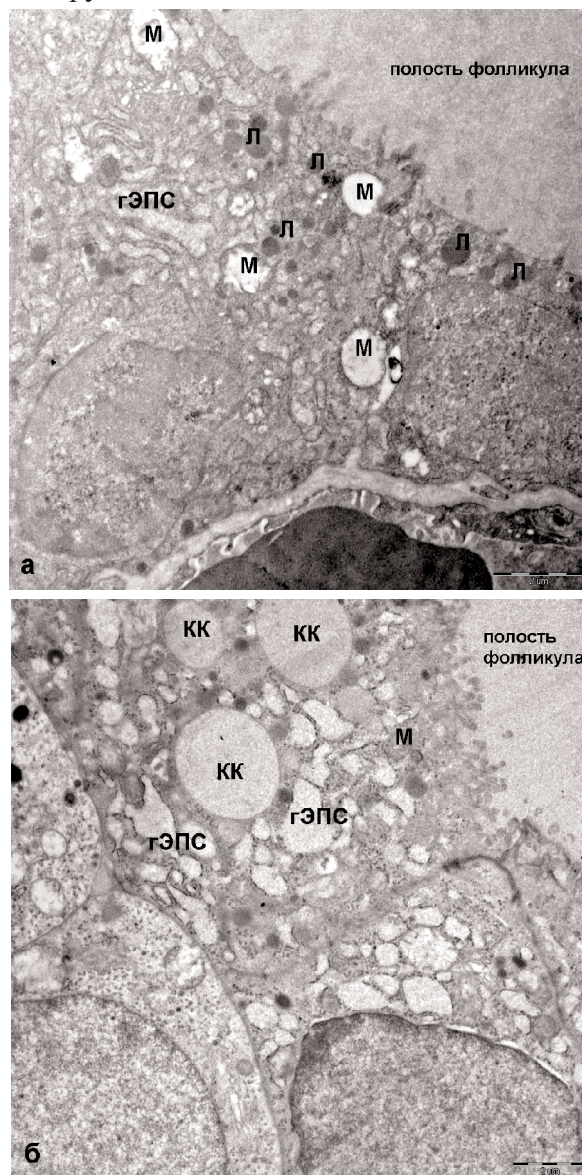


Рисунок 2.

Ультраструктура фолликулярных тироцитов щитовидной железы. Ув. $\times 4000$.

а - через 30 ч после введения ЛПС. Умеренное расширение канальцев гЭПС, набухание матрикса и деструкция крист митохондрий, большое количество лизосом в апикальных отделах тироцитов свидетельствуют о высокой активности синтеза и выделения тиреоглобулина в полость фолликула.

б - 6 часов после введения ТТГ через 24 часа после введения ЛПС. Значительное расширение гЭПС, большое количество крупных коллоидных капель в цитоплазме свидетельствуют об усилении синтетических и резорбционных процессов.

Обозначения: гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть, КК – капли коллоида, Л – лизосомы, М – митохондрии.

Полученные нами данные об изменении тиреоидного статуса крыс под воздействием эндотоксина свидетельствуют о развитии синдрома нетиреоидных заболеваний через 24 часа после введения ЛПС. Это согласуется с данными литературы о сроках развития функционального гипотиреоза [5]. По имеющимся в литературе данным, снижение продукции тиреоидных гормонов при воздействии ЛПС начинается с Т3, а по мере усиления тяжести заболевания присоединяется и снижение Т4 [6]. В нашем случае сочетанного снижения Т4 и Т3 не наблюдалось. Содержание Т3 и сТ3 не отличалось от контрольных значений, а иногда даже превышало их. Это свидетельствует о том, что при воздействии большой дозы ЛПС, вызывающей развитие системной воспалительной реакции, конверсия Т4 в Т3 не нарушается, то есть сохраняется высокая активность дейодиназы. Возможно, это является компенсаторной реакцией на снижение продукции Т4, направленной на повышение более активной формы тиреоидных гормонов. В таком случае синдром нетиреоидных заболеваний с таким тиреоидным статусом следует рассматривать, скорее всего, не как физиологическую, а как компенсаторную реакцию организма.

При сравнении тиреоидного статуса крыс групп Т и ЛТ выявлены различия, свидетельствующие, что введение ТТГ после ЛПС не приводит к восстановлению тиреоидного статуса ни до значений группы Т, ни до показателей контрольной группы. Если стимуляция рецепторов ТТГ приводила к увеличению пула более активного гормона Т3 и свободного для доступа в клетки-мишени сТ4 в сыворотке крови, то сочетанный эффект стимуляции толл-подобных рецепторов и рецепторов ТТГ приводил не только к увеличению биологически доступных свободных форм гормонов, но и к увеличению в крови их депонированных в виде связи с транспортными белками форм.

Обсуждая снижение концентрации Т4 в сыворотке крови нельзя не указать на то, что при развитии синдрома нетиреоидных заболеваний под воздействием ЛПС также наблюдается и снижение связывающей способности транспортных белков крови. Некоторые исследователи полагают, что наблюдаемое снижение общего Т4 в сыворотке крови обусловлено именно изменением структуры и метаболизма транспортирующих его белков. Аффинность Т4 к связывающим белкам довольно высока и снижение их связывающей способности неизбежно приводит к снижению концентрации Т4 в сыворотке крови в отличие от Т3, сродство которого к сывороточным белкам в 10 раз ниже, чем Т4 [7]. Возможное объяснение того факта, что наблюдаемое нами снижение концентрации общего Т4 в сыворотке крови не сопровождалось снижением концентрации общего Т3, обусловлено именно снижением связывающей способности сывороточных белков. Однако, во-первых, сочетанное снижение общего и свободного Т4 в сыворотке крови указывает на то, что причиной уменьшения концентрации общего Т4 в крови стало снижение его продукции щитовидной железой, а во-вторых, то, что при последующем введении ТТГ крысам наблюдалось повышение содержания в сыворотке крови общего Т4 и Т3 свидетельствует о нормальной связывающей функции транспортных белков.

Ключевым моментом в изучении эффектов активации толл-подобных рецепторов-4 липополисахаридом на фолликулярные тироциты *in vivo* является дифференцирование изменений, обусловленных гипофункцией гипоталамо-гипофизарного комплекса, и непосредственно вызванных воздействием на секреторную деятельность этих клеток. Секреторный цикл фолликулярных тироцитов включает синтез и выделение тиреоглобулина в полость фолликула, йодирование тиреоглобулина с его последующей резорбцией. Дальнейшие превращения тиреоглобулина происходят тремя путями: распад макромолекулы с отщеплением йодированных тиронинов; обратное выделение тиреоглобулина в полость фолликула без отщепления пептидазами йодированных тиронинов; переход через базолатеральную мембрану с выделением тиреоглобулина в кровь. Таким образом, к образованию тиреоидных гормонов приводит только первый путь.

Наблюдаемое нами увеличение продукции гормонов щитовидной железой под воздействием ТТГ на фоне ЛПС указывает на то, что эффекты, обусловленные активацией толл-подобных рецепторов-4, выражаются не только в снижении секреторной активности фолликулярных тироцитов. Возможно, что наблюдаемая гипотироксинемия обусловлена торможением распада молекулы тиреоглобулина, а не его синтеза. Описанные нами ранее морфофункциональные изменения щитовидной железы через сутки после введения ЛПС заключались в увеличении интенсивности синтетических процессов в фолликулярных тироцитах по отношению к резорбционным, то есть избыточном накоплении тиреоглобулина в полости фолликулов периферических зон щитовидной железы. Эти данные косвенно подтверждают выявленное *in vitro* усиление транскрипции гена тиреоглобулина в тироцитах под воздействием ЛПС [3]. В сыворотке крови отмечалось резкое падение концентрации Т4 при незначительном снижении ТТГ. В связи с чем возникла гипотеза, что столь выраженное снижение концентрации Т4 в крови обусловлено снижением резорбционных процессов, а также возможно и снижением активности лизосомальных пептидаз, отщепляющих Т4 и Т3 от резорбированного тиреоглобулина. Для проверки этой гипотезы мы изучили в данном эксперименте эффекты воздействия ТТГ на щитовидную железу, уже находящуюся в состоянии гипофункции, вызванной системным воспалительным ответом, развившемся под воздействием ЛПС. Введение ТТГ через сутки после ЛПС приводило к значительному усилению продукции Т4 и Т3 железой в течение 48 часов, а не к снижению по принципу обратной связи, наблюдавшемуся у крыс, получавших только ТТГ. Изучение ультраструктуры тироцитов показало, что морфологическим выражением активации толл-подобных рецепторов-4 явилось снижение интенсивности процессов резорбции по отношению к процессам синтеза и выделения тиреоглобулина. После введения ТТГ на фоне ЛПС появлялись признаки усиления синтетических и резорбтивных процессов. Следовательно, костимулирующий эффект на продукцию гормонов, по-видимому, был обусловлен тем, что ТТГ, являющийся активатором всех фаз секреторного цикла фолликулярных тироцитов, вызвал усиление резорбции накопленного под воздействием ЛПС тиреоглобулина и повышение активности лизосомальных эндо- и экзопептидаз. Это подтверждает и динамика Т4 у крыс, получавших только ЛПС. К 72-му часу после введения ЛПС, ингибирующее действие ЛПС на синтез ТТГ снизилось, что вызвало значительный рост продукции Т4 и Т3, концентрация которых в сыворотке крови превысила контрольные значения. Сочетанное воздействие ЛПС и ТТГ вызывает снижение эндогенного ТТГ (по принципу обратной связи) и выраженное стимулирующее действие как на продукцию тироксина щитовидной железой, так и на общую дейодиназную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

1. Изменения в организме, обусловленные активацией толл-подобных рецепторов-4 липополисахаридом, вызывают снижение функциональной активности гипофиза, что в свою очередь, приводит к снижению функциональной активности щитовидной железы, но не оказывают влияния на активность дейодиназ, конвертирующих тироксин в 3,3,5'-трийодтиронин.

2. Липополисахарид является амбивалентным фактором по отношению к щитовидной железе — частичным активатором и ингибитором различных фаз секреторного цикла фолликулярных тироцитов, в отличие от ТТГ, активирующего все стадии гормоногенеза.

3. Эффекты активации толл-подобных рецепторов-4 *in vivo* на щитовидную железу связаны со снижением интенсивности резорбционных процессов и возможно активности эндо- и экзопептидаз, вызывающих распад интернализированного тиреоглобулина в тироцитах и образование тироксина.

4. Активация толл-подобных рецепторов-4 приводит к накоплению в фолликулах предшественника тиреоидных гормонов. Активация рецепторов ТТГ преимущественно увеличивает количество доступных для клеток-мишеней

форм гормонов, а последовательная стимуляция толл-подобных рецепторов-4 и рецепторов ТТГ - к депонированию тиреоидных гормонов в системном кровотоке.

5. Основной причиной уменьшения концентрации циркулирующего тироксина является снижение его продукции щитовидной железой, а не уменьшение связывающей способности транспортирующих его сывороточных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamazaki K., Suzuki K., Yamada E., Yamada T., Takeshita F., Matsumoto M., Mitsuhashi T., Obara T., Takano K., Sato K. (2007) *Endocrinology*, **148**, 3226-3235.
2. Nicola J., Velez M., Lucero A., Fozzatti L., Pellizas C., Masini-Repiso A. (2009) *Endocrinology*, **150**, 500-508.
3. Velez M., Costamagna E., Kimura E., Fozzatti L., Pellizas C., Montesinos M., Lucero A., Coleoni H., Santisteban P., Masini-Repiso A. (2006) *Endocrinology*, **147**, 3260-3275.
4. Rocchi R., Kimura H., Tzou S.-C., Suzuki K., Rose N., Pinchera A., Ladenson P., Caturegli P. (2007) *PNAS*, **104**, 6019-6024.
5. Boelen A., Kwakkel J., Alkemade A., Fliers E., Wiersinga W. (2004) *J. Endocrinol.*, **182**, 315-323.
6. Papanicolaou D. (2000) *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **1**, 43-48.
7. Den Brinker M., Joosten K., Visser T., Hop W., de Rijke Y., Hazelzet J., Boonstra V., Hokken-Koelega A. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 5613-5620.

Поступила: 27. 09. 2009.

REGULATION OF THYROID AND PITUITARY FUNCTION BY BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

N.V. Yaglova¹, T.T. Berezov^{2,3}

¹Institute of Human Morphology RAMS, Tsurupa st.. 3, Moscow, 117418 Russia;
tel./fax: +7-499-120-80-65; e-mail: yaglova@mail.ru

²Russian Peoples' Friendship University, Moscow, Russia

³Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Activation of toll-like receptors-4 by bacterial lipopolysaccharide downregulates pituitary and thyroid function. Besides decrease of thyroid-stimulating hormone secretion lipopolysaccharide affects secretion in follicular thyroid cells directly. The endotoxin partially activates and inhibits different phases of follicular thyrocytes' secretion. Lipopolysaccharide enhances thyroglobulin synthesis and exocytosis into follicular lumen and supresses its resorbtion. It results in sharp drop of blood thyroxine concentration without decrease of deiodinases-mediated thiroxine to triiodothyronine conversion. Stimulation of the lipopolysaccharide-pretreated thyroid gland with thyroid-stimulating hormone increases resorbtion of thyroglobulin and thyroid hormone production. Combined stimulation of the thyroid gland increases protein bound thyroxine and triiodothyronine serum concentration unlike only TSH stimulation resulting in increase of free thyroid hormone levels. It also proves that binding capacity of thyroid hormone serum transport proteins during nonthyroidal illness syndrome remains normal.

Key words: lipopolysaccharide, toll-like receptos-4, thyroid, hypophysis, hormones.