УДК [616(441+097)]:616.-097
©Яглова, Яглов

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА НА УРОВЕНЬ БЕЛКОВ-АУТОАНТИГЕНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И АНТИТИРЕОИДНЫХ АУТОАНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Н.В. Яглова*, В.В. Яглов

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

Исследовали изменения секреции белков-аутоантигенов щитовидной железы и продукции аутоантител к ним при длительном воздействии низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ). Выявлено изменение уровня сывороточных аутоантител к тиреопероксидазе, которое коррелирует с изменениями её концентрации в сыворотке крови, обусловленными дисрапторным действием ДДТ на продукцию тироксина фолликулярными тироцитами. Длительное воздействие низких доз ДДТ не вызывает избирательного повышения уровня антител к какому-либо из белков щитовидной железы. Повышение соотношения антитело/антиген при воздействии различных доз ДДТ в отношении тиреопероксидазы и тиреоглобулина характеризуется небольшими значениями, а соответственно не может рассматриваться как достоверный патогномоничный признак аутоиммунного процесса.

Ключевые слова: эндокринные дисрапторы, ДДТ, щитовидная железа, аутоантитела

DOI: 10.18097/PBMC20166201073

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается увеличение числа аутоиммунных заболеваний, среди которых наиболее распространёнными являются аутоиммунные болезни щитовидной железы. В промышленно развитых странах их частота превышает показатели заболеваемости болезнями сердечно-сосудистой системы [1]. По оценкам специалистов, аутоиммунные заболевания щитовидной железы диагностируются только в третьей части случаев, поэтому реальное количество больных данной патологией может быть значительно больше официальных 7-8% [2, 3]. Основным диагностическим признаком развития аутоиммунного процесса в щитовидной железе считается повышение содержания в системном кровотоке аутоантител к белкам щитовидной железы: тиреоглобулину (ТГ), тиреопероксидазе (ТПО) и рецептору тиреотропного гормона (ТТГр). Однако положительные результаты анализов не всегда сочетаются с наличием эндокринных изменений [4, 5]. Считается, что основными причинами развития аутоиммунных процессов в щитовидной железе является нарушение толерантности к аутоантигенам щитовидной железы у генетически предрасположенных лиц в сочетании с неблагоприятным действием факторов окружающей среды [6]. Среди антропогенных факторов окружающей среды, способных изменять функционирование желез внутренней секреции, большая роль отводится эндокринным дисрапторам, воздействующим в низких дозах на человека в силу их повсеместного распространения [7, 8]. Несмотря на большое количество исследований в этой области, очень мало работ посвщено изучению взаимосвязи между действием эндокринных дисрапторов на щитовидную железу и развитием в ней аутоиммунного процесса. В наших предыдущих исследованиях было установлено изменение тиреоидного статуса при воздействии низких доз наиболее распространенного на планете эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) [9].

Целью настоящего исследования было выявление изменений секреции белков-аутоантигенов щитовидной железы и продукции аутоантител к ним при длительном воздействии низких доз ДДТ.

МЕТОДИКА

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=64) массой тела 80-100 гг. Животные опытных групп вместо воды получали растворы *о,п*-ДДТ (“Sigma”, США) с концентрацией 20 мкг/л (n=22) и 80 мкг/л (n=20) в течение 6 и 10 недель. Количество потребляемого ДДТ рассчитывали в соответствии с требованиями National Toxicology Problem (США) [10] к определению низких доз, с учётом пороговых значений низких доз для ДДТ (50 мкг/кг/сут) [11] и нормативам содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации [12]. Среднесуточное потребление ДДТ составило 1,89±0,86 и 7,77±0,17 мкг/кг, соответственно. Животные контрольных групп (n=20) получали водопроводную воду. Отсутствие в водопроводной воде и корме для лабораторных животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Первую половину опытных и контрольных животных выводили из эксперимента через 6 нед, вторую половину через 10 нед передозировкой золетила. Эксперимент проведён в соответствии с правилами проведения

* - адресат для переписки

работ с использованием экспериментальных животных, утверждёнными приказом Минздрава СССР №577 от 12.08.1977. Концентрации свободного тироксина (сТ4), ТПО, ТГ, натрий-йодного симпортера (НЙС), антител к ТПО (антиТПО), к ТГ (антиТГ) и рецептору тиреотропного гормона (антиТТГр) определяли в сыворотке крови методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов “Cusabio Biotech” (Китай) и “Monobind” (США). Морфологическое исследование щитовидной железы проводили методом световой микроскопии гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (“Statsoft Inc.”, США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учётом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, а также критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p<0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 6 нед потребления ДДТ в дозе 1,89±0,86 мкг/кг/сут у крыс отмечали небольшое увеличение концентрации Т4 в сыворотке крови на фоне резкого снижения концентрации НЙС и повышения секреции ТПО по сравнению со значениями контрольной группы. Концентрация антиТПО также была повышена (таблица). Таким образом, содержание антител на 1 нг антигена/мл практически не изменилось (рис. 1). Содержание ТГ в сыворотке крови также статистически значимо повысилось (таблица), а уровень антител к тиреоглобулину не изменился, вследствие чего содержание антиТГ на 1 нг антигена понизилось (рис. 2). Концентрация антиТТГр не отличалась от значений контрольной группы.

В паренхиме долей щитовидной железы крыс наблюдались региональные изменения по сравнению с контрольной группой. В периферической зоне долей происходило увеличение размера фолликулов, но существенного уменьшения высоты фолликулярных тироцитов не наблюдалось. В центральной зоне долей происходило уменьшение размеров фолликулов и увеличение высоты фолликулярных тироцитов.

Таблица. Изменения концентрации тиреоидных гормонов, белков-аутоантигенов щитовидной железы и антител к ним в сыворотке крови крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана.

Исследуемый параметр	Длительность воздействия	
	6 недель	10 недель
Т4, мкг/дл		
Контрольная группа	2,77±0,16	3,15±0,18
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	3,26±0,12*	3,68±0,22
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	3,38±0,11*	3,12±0,11
сТ4, нг/дл		
Контрольная группа	1,58±0,06	1,77±0,03#
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	1,72±0,05*	1,61±0,07
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	1,73±0,04*	1,63±0,04*
Na^+/I^--симпортер, пг/мл		
Контрольная группа	2,36±0,05	2,13±0,25
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	0,51±0,06*	2,96±0,33#
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	0,97±0,11*	1,81±0,22#
Тиреопероксидаза, нг/мл		
Контрольная группа	3,52±0,11	4,41±0,15#
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	4,47±0,06*	4,70±0,12
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	4,95±0,29*	4,67±0,07*
Антитела к тиреопероксидазе, МЕ/мл		
Контрольная группа	6,94±0,27	8,38±0,26#
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	8,66±0,18*	8,92±0,19
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	9,14±0,22*	8,99±0,11*
Тиреоглобулин, нг/мл		
Контрольная группа	19,51±0,13	21,42±0,21#
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	20,79±0,55*	21,96±0,55
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	21,02±0,88	21,65±0,65
Антитела к тиреоглобулину, МЕ/мл		
Контрольная группа	51,81±0,35	51,62±5,24
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	50,82±1,83	54,27±1,99
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	53,32±1,93	55,14±4,05
Антитела к рецептору ТТГ, МЕ/мл		
Контрольная группа	37,64±0,51	38,56±0,21
ДДТ 1,89±0,86 мкг/кг/сут	40,07±1,17	38,03±0,38
ДДТ 7,77±0,17 мкг/кг/сут	38,36±0,19	39,72±0,36*#

Примечание: * - статистически значимые отличия от контрольной группы, # - от предыдущего срока исследования.

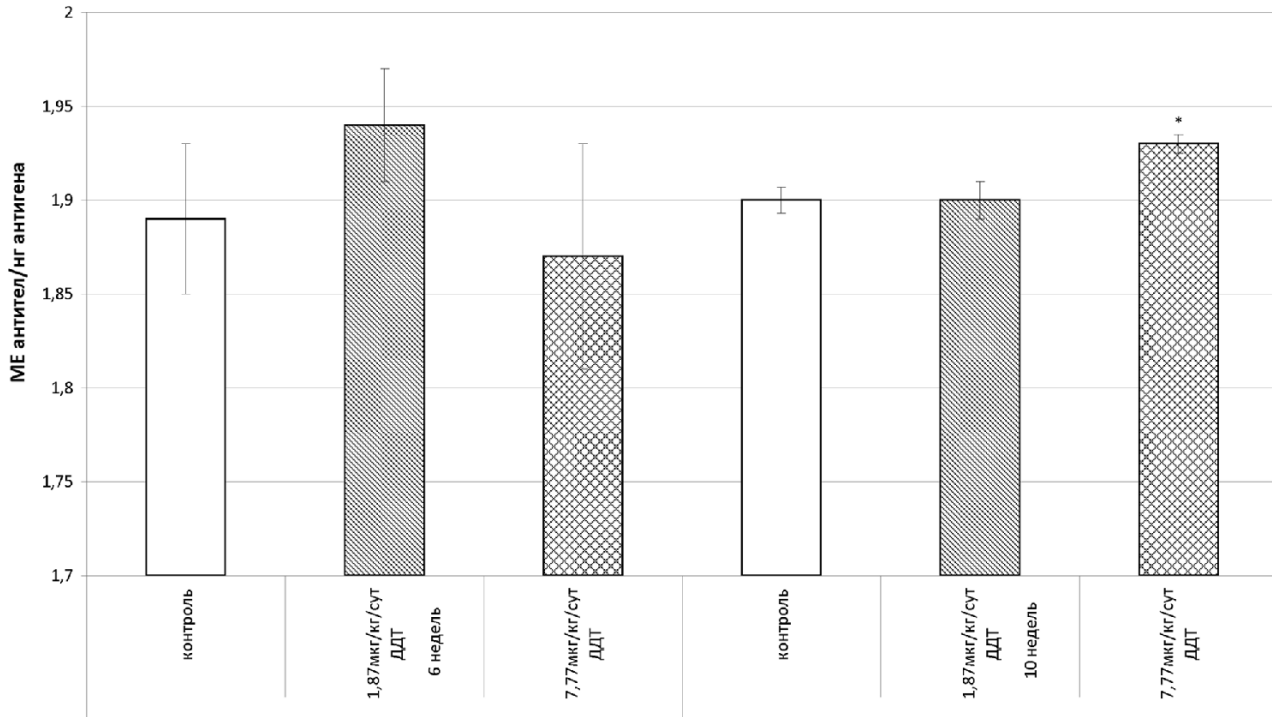

Рисунок 1. Изменения соотношения содержания антител к тиреопероксидазе к содержанию тиреопероксидазы в сыворотке крови крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. * - статистически значимые отличия от контрольной группы.

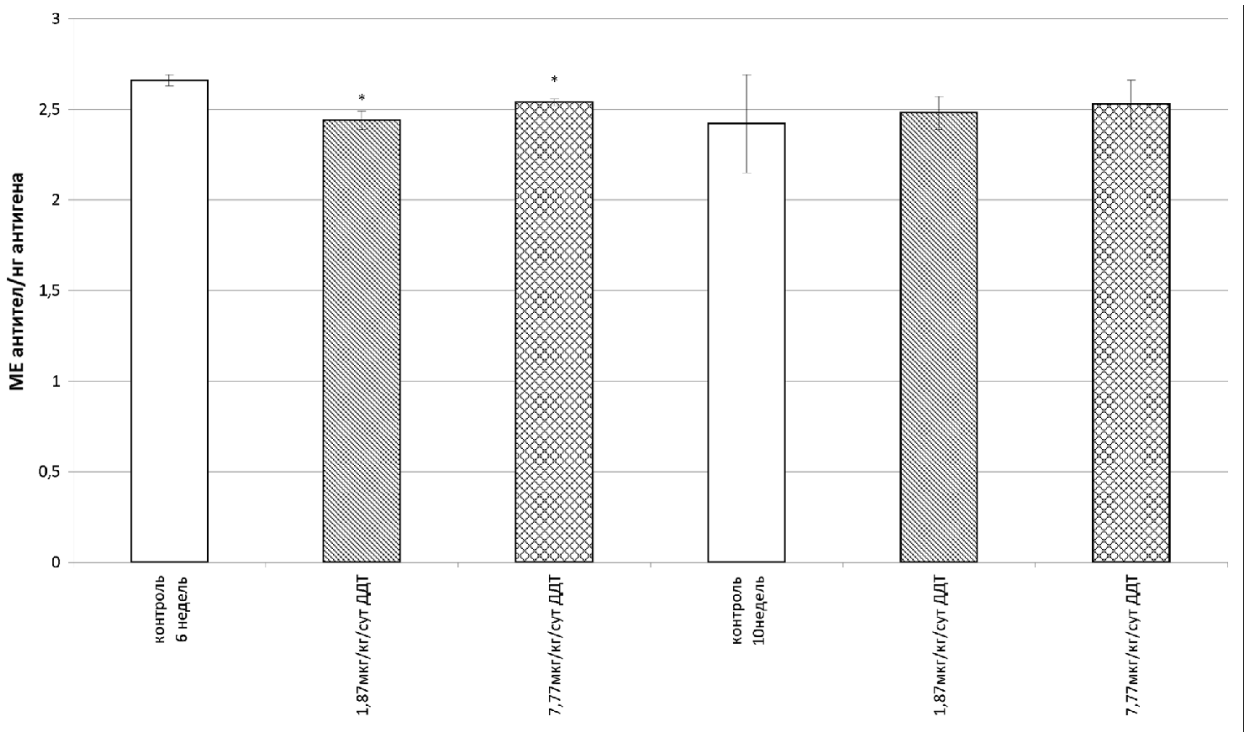

Рисунок 2. Изменения соотношения содержания антител к тиреоглобулину к содержанию тиреоглобулина в сыворотке крови крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. * - статистически значимые отличия от контрольной группы.

Отмечалось незначительное уменьшение содержания коллоида в просветах фолликулов. Изменений микроциркуляторного русла не наблюдалось. Десквамация фолликулярных тироцитов в полость фолликулов была слабо выражена, как и в контрольной группе. Лейкоцитарная инфильтрация стромы отсутствовала.

Через 6 нед потребления ДДТ в дозе 7,77±0,17 мкг/кг/сут у крыс также наблюдали повышение концентрации Т4 в сыворотке крови

в сочетании со статистически значимым снижением НЙС и увеличением сывороточных ТПО и антиТПО (таблица). Вследствие этого содержание антител на 1 нг антигена/мл практически не изменялось (как и в предыдущей опытной группе) и не отличалось от значений контрольной группы (рис. 1). Изменения концентрации сывороточного ТГ и антиТГ были не существенны, но соотношение антиТГ/ТГ статистически значимо уменьшилось по сравнению с контрольной группой и не отличалось от группы сравнения, получавшей меньшую дозу ДДТ (рис. 2). Содержание антиТТГр не изменялось и не отличалось от контрольных значений (таблица).

При морфологическом исследовании щитовидной железы выявлены аналогичные, но более выраженные изменения в строении паренхимы долей.

Через 10 нед после начала эксперимента у животных контрольной группы выявляли повышение продукции Т4, содержание НЙС не изменялось. Одновременно наблюдали повышение концентрации как ТПО, так и антиТПО в сыворотке крови по сравнению с предыдущим сроком исследования (таблица). Поскольку количественное увеличение этих показателей было аналогичным, соотношение антитело/антиген для ТПО не изменялось (рис. 1). Секреция ТГ в системный кровоток повышалась, но содержание антиТГ не изменялось по сравнению с предыдущим сроком исследования (таблица). Соответственно, соотношение антиТГ/ТГ снизилось (рис. 2). Концентрация антиТТГр в сыворотке крови также не изменялась (таблица).

Исследование гистологических препаратов ЩЖ крыс контрольной группы выявило изменения по сравнению с предыдущим сроком исследования. Наблюдалось усиление различий в строении периферической и центральной зон долей ЩЖ, связанное с увеличением размеров фолликулов в периферических зонах и уменьшением – в центральных. Десквамация эпителия в полость фолликулов была слабо выражена.

Через 10 нед потребления ДДТ в дозе 1,89±0,86 мкг/кг/сут у крыс продукция Т4 щитовидной железой не претерпела значительных изменений. Уровень НЙС повысился, но статистически значимо не отличался от показателей контрольной группы. Концентрация ТПО и антиТПО в сыворотке крови существенно не изменялась по сравнению со значениями контрольной группы и значениями предыдущего срока исследования (таблица). Соотношение антиТПО/ТПО не изменялось и не отличалось от значений контрольной группы (рис. 1). Повышение уровня ТГ и антиТГ, а также их соотношения не достигло статистической значимости по сравнению как с предыдущим сроком исследования, так и значениями контрольной группы (табл.ица, рис. 2). Концентрация антиТТГр незначительно уменьшилась и не отличалась от значений контрольной группы (таблица).

При изучении гистологических препаратов щитовидной железы были отмечены схожие с контрольной группой морфодинамические процессы.

В группе крыс, потреблявших ДДТ в дозе 7,77±0,17 мкг/кг/сут в течение 10 нед, отмечали снижение концентрации сТ4 в сыворотке крови. Концентрация НЙС в сыворотке крови повысилась по сравнению с предыдущим сроком исследования до значений контрольной группы. Содержание ТПО в системном кровотоке было большим, чем в контрольной группе. Уровень антиТПО в сыворотке крови был максимальным в сравниваемых группах данного срока исследования (таблица). Содержание антиТПО на 1нг антигена превысило как значения контрольной группы, так и опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ (рис. 1). Выделение ТГ в системный кровоток не изменялось ни по сравнению с предыдущим сроком исследования, ни контрольной группой, ни группой, потреблявшей ДДТ в дозе 1,89±0,86 мкг/кг/сут. Уровень антиТГ также не отличался от значений сравниваемых групп (таблица). Содержание антиТГ на 1 нг ТГ было наибольшим среди групп данного срока исследования, но эти различия не достигали статистической значимости (рис. 2). По сравнению с предыдущим сроком исследования отмечали статистически значимое повышение синтеза антиТТГр. Уровень антиТТГр также значимо превышал показатели контрольной группы аналогичного срока исследования и группы, потреблявшей ДДТ в меньшей дозе (таблица).

Паренхима щитовидной железы была представлена фолликулами меньшего размера, чем в контрольной группе. Усиления гибели клеток или появления лейкоцитарной инфильтрации не наблюдали.

Изменение сывороточных тиреоидных аутоантигенов и аутоантител к ним в организме крыс наблюдалось как через 6, так и 10 недель потребления низких доз ДДТ. При этом необходимо учитывать, что концентрация тиреоидных аутоантигенов в сыворотке крови изменяется в соответствии с функциональной активностью щитовидной железы, поэтому при оценке изменений уровня аутоантигенов и аутоантител необходимо принимать во внимание уровень продукции тироксина. В данном случае через 10 нед после начала эксперимента у крыс контрольной группы наблюдалось повышение секреции Т4, обусловленное изменениями микроклимата вивария. Увеличение концентрации Т4 в контрольной группе было обусловлено повышением синтеза тиреоглобулина и его йодирования за счёт усиления окислительно-восстановительных реакций, о чем свидетельствует увеличение содержания ТПО и антиТПО в сыворотке крови без изменений экспрессии НЙС, что полностью соответствует литературным данным о наличии сильной корреляции между такими показателями как сывороточная концентрация Т4, ТПО и антиТПО [13]. Одновременно увеличивалась и секреция в системный кровоток прогормона ТГ, но это не вызывало увеличения синтеза антител к нему. Также повышение функциональной активности щитовидной железы не влияло на уровень антиТТГр.

Известно, что из белков-аутоантигенов щитовидной железы наибольшей иммуногенностью обладает ТГ, вследствие его высокой экспрессии, большого

размера молекулы и большого содержания остатков ароматических аминокислот [13, 14]. Ни через 6, ни через 10 недель воздействия низких доз ДДТ статистически значимого повышения уровня аутоантител на 1 нг ТГ не выявлено. В отношении антиТПО повышение продукции антител на 1 нг антигена наблюдалось через 10 недель только у крыс, потреблявших большую дозу ДДТ, но оно составило менее 5% от значений контрольной группы. Необходимо также учитывать, что усиление синтеза антиТПО имеет большее патогенетическое значение, чем антиТГ, так как у больных аутоиммунным тироидитом всегда выявляется повышение уровня антиТПО, которое коррелирует с другими клинико-лабораторными данными в активной фазе заболевания [15, 16]. В отличие от антиТГ, антиТПО могут напрямую повреждать тироциты путём активации комплемента [15]. Повышение уровня антител к рецептору ТТГ наблюдалось только при воздействии ДДТ в дозах, превышающих среднесуточное потребление дисраптора с учётом нормативов его содержания в продуктах питания, но и оно составляло не более 3%. Результаты данного исследования не выявляют взаимосвязи между воздействием эндокринного дисраптора и повышением уровня аутоантител к какому-либо конкретному тиреоидному аутоантигену. Морфологическое исследование щитовидной железы не выявило признаков, характерных для развития аутоиммунного процесса, таких как гибель фолликулярного эпителия и инфильтрация стромы железы лимфоцитами.

Скрининговые исследования населения, подверженного воздействию хлорорганических пестицидов, показывают увеличение частоты субклинических и клинических форм аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. По одним данным, у лиц, подвергающихся воздействию ДДТ и его метаболитов, гексахлорциклогексана и алдрина повышение концентрации антиТПО в сыворотке крови более выражено, чем антиТГ как в количественном отношении, так и по распространённости в исследуемых выборках [17]. По другим данным, между концентрацией метаболитов ДДТ и анти ТПО в сыворотке крови существует корреляция, но она чрезвычайно низка [18]. Возможно, связь между воздействием дисрапторов и риском развития аутоиммунных процессов в щитовидной железе существует, но она не прямая, а опосредована соответствующими изменениями в иммунной системе. В наших предыдущих исследованиях мы обнаруживали значительные изменения морфофункциональных характеристик иммунной системы крыс при аналогичном по длительности воздействии низких доз ДДТ. Потребление низких доз ДДТ вызывало гибель Т- и В-лимфоцитов, структурные перестройки тимуса и селезенки, снижение пролиферативной активности лимфоцитов и изменения секреции цитокинов, коррелирующие с изменениями процессов гибели и пролиферации клеток лимфоидного происхождения [19, 20]. Следовательно, связь между повышением риска развития аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и воздействием низких доз ДДТ может быть связана с реактивными нарушениями баланса Тхелпер1 и Тхелпер2 цитокинов в организме и пролиферативных процессов в центральных и периферических органах иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Воздействие низких доз ДДТ вызывает изменение уровня сывороточных аутоантител к тиреопероксидазе, которое коррелирует с изменениями её концентрации в сыворотке крови, обусловленными дисрапторным действием ДДТ на продукцию тироксина фолликулярными тироцитами. Повышение соотношения антитело : антиген наблюдается только при длительном воздействии в дозах, превышающих среднесуточное потребление ДДТ с продуктами питания при максимально допустимых уровнях его содержания.

Увеличение содержания аутоантител на единицу массы антигена при воздействии различных доз ДДТ в отношении тиреоглобулина характеризуется небольшими значениями, и, соответственно, не может рассматриваться как достоверный патогномоничный признак аутоиммунного процесса.

Длительное воздействие низких доз ДДТ не вызывает избирательного повышения синтеза антител к какому-либо из белков щитовидной железы.

Для повышения достоверности результатов скрининговых исследований определение содержания антитиреоидных аутоантител в сыворотке крови целесообразно проводить с учётом количественного содержания аутоантигенов щитовидной железы в системном кровотоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. United States Department of Health and Human Services Progress in Autoimmune Diseases Research, Report to Congress, National Institutes of Health, The Autoimmune Diseases Coordinating Committee (2005) 146p.
2. *Dayan C., Daniels G.* (1996) N. Engl. J. Med., **335**, 99-107.
3. *Weetman A.* (2000) N. Engl. J. Med., **343**, 1236-1248.
4. *Hollowell J.G., Staehling N.W., Flanders W.D., Hannon W., Gunter E., Spencer C., Braverman L.* (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab., **87**, 489-499.
5. *Patrick L.* (2009) Alternative Medicine Review, **14**(4), 326-346.
6. *Tomer Y., Huber A.* (2009) J. Autoimmun., **32**, 231-239.
7. *Яглова Н.В., Яглов В.В.* (2012) Вестник РАМН, №3, 56-61.
8. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO (2013) 296p.
9. *Яглов В.В., Яглова Н.В.* (2014) Современные технологии в медицине, **6**(4), 55-61.
10. National Toxicology Program (2001) National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low dose peer review. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

11. *Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D. Jr., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller T., Myers J.* (2012) Endocrine Reviews, **33**(3), 378-455.
12. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (2008) СанПин 2.3.2.1078-01.
13. *McLachlan S., Rapoport B.* (1992) Endocrine Reviews, **13**, 192-206.
14. *Яглова Н.В.* (2014) Клин. экспер.морфол., №4, 14-22.
15. *Yoshida H., Amino N., Yagawa K., Uemura K., Satoh M., Miyai K., Kumahara Y.* (1978) J. Clin. Endocrinol. Metab., **46**, 859-862.
16. *Jansson R., Thompson P., Clark F, McLachlan S.* (1986) Clin. Exp. Immunol., **63**, 80-86.
17. *Freire C., Koifman R., Novaes Sarcinelli P., Simoes Rosa A., Clapauch R., Koifman S.* (2014) Environm. Res., **217**, 370-378.
18. *Langer P., Tajtakova M., Kocan A., Drobna B., Kostalova L., Fodor G., Klimes I.* (2012) Endocr. Regul., **46**, 191-203.
19. *Яглова Н.В., Родиченко Е.П., Яглов В.В.* (2012) Иммунология, **33**(2), 98-102.
20. *Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В.* (2013) Бюлл. экспер. биол. мед., **155**(5), 657-660.

Поступила: 08. 04. 2015.
Принята к печати: 22. 06. 2015.

THE EFFECT OF LONG-TERM EXPOSURE TO LOW DOSES OF ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ON SERUM LEVELS OF THYROID PROTEIN AUTOANTIGENES AND ANTITHYROID AUTOANTIBODIES

N.V. Yaglova, V.V. Yaglov

Research Institute of Human Morphology,
3 Tsurupa str., Moscow, 117418 Russia; tel./fax: (499)120-80-65; e-mail: yaglova@mail.ru

Changes in secretion of thyroid autoantigenes and production of antithyroid autoantibodies after long-term exposure to low doses of DDT were studied. Changes in serum levels of antithyroid peroxidase antibodies and thyroid peroxidase, attributed to disruption of thyroxine production by DDT were found. Long-term exposure of rats to low doses of DDT revealed no specific impact on serum autoantibodies to all thyroid autoantigenes studied. The increase of the ratio of autoantibody/autoantigen for thyroid peroxidase and thyroglobulin was rather small and thus could not be considered as a significant symptom of thyroid autoimmunity.

Key words: endocrine disruptors, DDT, thyroid, autoantibody