

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.441-006.5-06:616.441-008.61]-076.5

С. И. Крайнова, И. В. Крюкова, Н. А. Мкртумова, Ю. М. Кеда, В. И. Кандроп

СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА "НОРМАЛЬНЫХ" ТИРЕОЦИТОВ ЛИМФОЦИТАМИ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИМИ ТКАНЬ ДИФФУЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ЗОБА*

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Исследовали способность лимфоцитов, изолированных из ткани диффузного токсического зоба (ДТЗ), ускорять пролиферацию "нормальных" тиреоцитов (изолированных из околоузловой ткани узлового эутиреоидного зоба). "Нормальные" и выделенные из ткани ДТЗ тиреоциты инкубировали 24 ч в присутствии различных концентраций эмбриональной сыворотки теленка (FCS), лимфоцитов из ДТЗ или околоузловой ткани либо FCS и лимфоцитов одновременно. Полученные данные показали, что в присутствии только FCS скорость пролиферации "нормальных" тиреоцитов увеличивалась параллельно концентрации эмбриональной сыворотки. Скорость пролиферации тиреоцитов из ДТЗ от концентрации FCS не зависела. Лимфоциты из ДТЗ, но не из околоузловой ткани стимулировали пролиферацию "нормальных" тиреоцитов. Ростстимулирующий эффект лимфоцитов из ДТЗ сопровождался потерей способности "нормальных" тиреоцитов реагировать на увеличение концентрации ростовых факторов (FCS) в среде культивирования. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли интратиреоидных лимфоцитов при ДТЗ в генезе характерного для данного заболевания увеличения количества тиреоцитов и подтверждают высказанное ранее предположение о снижении экспрессии поверхностных антигенов (рецепторов) на клетках ДТЗ под действием интратиреоидных лимфоцитов.

The capacity of lymphocytes isolated from diffuse toxic goiter (DTG) tissue to stimulate the proliferation of normal thyrocytes isolated from paranodular tissue adjacent to nodular euthyroid goiter was studied. Normal and DTG thyrocytes were incubated for 24 h with fetal calf serum (FCS) in various concentrations, DTG or paranodular lymphocytes, or both FCS and lymphocytes. The proliferation rate of normal thyrocytes in the presence of FCS alone increased with increase of the serum concentration, while the proliferation rate of DTG thyrocytes did not depend on the concentration of FCS. DTG lymphocytes, but not paranodular ones, stimulated the proliferation of normal thyrocytes. The growth-stimulating effect of DTG lymphocytes was paralleled by loss of normal thyrocytes sensitivity to growth factors (FCS). These data indicate a probable role of intrathyroid lymphocytes in increase of thyrocyte count characteristic of DTG and confirm a previous hypothesis on decrease in expression of surface antigens (receptors) on DTG cells under the effect of intrathyroid lymphocytes.

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы — диффузный токсический зоб (ДТЗ) и тиреоидит Хашимото (ТХ) — характеризуются лимфоидной инфильтрацией органа и присутствием в сыворотке крови антитиреоидных антител. Коренное различие между этими заболеваниями заключается в том, что при ДТЗ происходят активация и пролиферация тиреоцитов, а при ТХ — их гибель и замещение лимфоидными элементами. Причины и механизмы усиления пролиферации клеток щитовидной железы при ДТЗ остаются неясными [3]. Учитывая принципиальную возможность стимулирующего действия лимфоцитов на пролиферацию клеток-мишеней [1, 2], в настоящей работе мы попытались выяснить, не связано ли характерное для ДТЗ нарастание массы тиреоцитов с действием интратиреоидных лимфоцитов (или их продуктов).

Ранее нами было показано, что *in vitro* тиреоциты из ДТЗ отличаются от "нормальных" (выделенных из околоузловой ткани эутиреоидного узлового зоба) существенно меньшей чувствительностью к цитотоксическому действию комплементфиксирующих аутоантител и значительно меньшим связыванием сывороточных антител, что трактовалось в пользу снижения количества поверхностных антигенов (рецепторов) на этих клетках [5]. Такое снижение ин-

дуцировалось на "нормальных" клетках в ходе их преинкубации с лимфоцитами из ДТЗ [4, 5]. Поскольку количество поверхностных антигенов снижается в процессе клеточного деления [12], описанный выше эффект лимфоцитов из ДТЗ мог бы явиться следствием ростстимулирующего действия последних на клетки щитовидной железы.

Материалы и методы

Тиреоциты выделяли из тканей щитовидных желез, полученных при операции больных с эутиреоидным узловым зобом и ДТЗ, как описано ранее [5]. Операции выполняли в хирургическом отделении (зав. — доктор мед. наук Н. С. Кузнецов) ЭНЦ РАМН.

Ткань измельчали ножницами и инкубировали 3 ч в растворе Hanks без Ca^{2+} и Mg^{2+} (pH 7,2) с 1 мг/мл коллагеназы ("Boeingher") при постоянном встряхивании. Клеточные конгломераты измельчали далее с помощью пипетирования, фильтровали через крупноячеистый фильтр и трижды центрифугировали в среде MEM при 400 g в течение 45 с. Для отделения лимфоцитов от тиреоцитов взвесь клеток центрифугировали при 200 g в течение 1 мин. Цитологический анализ подтвердил преимущественное присутствие кластеров тиреоцитов в осадке, а лимфоцитов — в супернатанте. Клетки культивировали в среде 199 на Hanks-балансируемом солевом растворе (pH 7,2) с 0,6 мг/мл глутамина, 2,4 мг/мл

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 98-04-49282).

Таблица 1

Динамика роста тиреоцитов в присутствии разных концентраций FCS ($M \pm m$)

Тиреоциты	Концентрация FCS			
	0%	0,5%	5%	10%
"Нормальные"	100	141 ± 9*	164 ± 7*	160 ± 11
ДТЗ	100	100 ± 10	89 ± 12	104 ± 13

Примечание. Приведены средние величины (в процентах) из 5 экспериментов; эффект каждой концентрации FCS в опыте оценивали по оптической плотности ($D = 594$ нм) окрашенных препаратов не менее, чем в 8 лунках. Звездочкой отмечены величины, статистически значимо ($p < 0,05$) отличающиеся от величин предыдущего столбца.

НЕРЕС, пенициллином и стрептомицином (по 50 ЕД/мл) и эмбриональной сывороткой теленка (FCS) в различных концентрациях.

Тиреоциты и лимфоциты (по 50 000 клеток) помещали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета и инкубировали при 37°C в насыщенной CO₂ и водяным паром атмосфере. По окончании культивирования ростовую среду удаляли, клетки промывали средой 199, высушивали на воздухе, фиксировали 96% этиловым спиртом не менее 20 мин и окрашивали в течение 30 мин раствором азура (1 г/л). Окрашенный препарат промывали водой, высушивали и для получения гомогенной окраски перед просмотром заливали этиловым спиртом (100 мкл/лунка), экстрагирующим краситель. Окончательное количество клеток в лунках оценивали по интенсивности окраски (величине оптической плотности при $D = 594$ нм, определяемой на многоканальном вертикальном спектрофотометре ЭФОС). Альтернативно клетки культивировали в лунках с покрытым агаром дном; подсчет клеток производили в камере Горяева.

Результаты и их обсуждение

Вначале мы сравнивали динамику роста "нормальных" тиреоцитов с таковой тиреоцитов, выделенных из ткани ДТЗ. Эксперименты проводили в присутствии FCS в концентрации 0,5, 5 и 10%. (табл. 1).

В первые 24 ч культивирования количество "нормальных" тиреоцитов увеличивается параллельно концентрации FCS в среде, что соответствует данным литературы [8]. В отличие от "нормальных" клеток интенсивность роста тиреоцитов, выделенных из ткани ДТЗ, не зависела от концентрации FCS. Эта особенность роста тиреоцитов из ДТЗ выявлена нами впервые. Она могла бы быть связана с тем, что в тиреоцитах из ДТЗ рецепторы присутствующих в FCS ростовых факторов были исходно оккупированы гипотетическими ростстимулирующими антителами. Однако, как показано нами ранее с помощью клеточного иммуноферментного метода [5], при использованном способе выделения клеток антитела на поверхности тиреоцитов из ДТЗ отсутствуют. Полученные данные могут свидетельствовать о снижении на поверхности тиреоцитов из ДТЗ количества рецепторов к внеклеточным факторам роста, присутствующим в FCS. Такая трактовка соответствует ранее высказанному предположению [4, 5] об общем снижении количества поверхностных антигенов на тиреоцитах из ДТЗ. Следует отметить, то зависи-

мость роста "нормальных" тиреоцитов от концентрации FCS регистрировалась нами лишь при 24-часовой инкубации клеток, но не при более длительных (72 ч) сроках культивирования.

В последующих экспериментах "нормальные" тиреоциты инкубировали с лимфоцитами, изолированными из ткани ДТЗ. Для выявления возможного эффекта таких предсенсibiliзированных лимфоцитов срок совместной инкубации в наших опытах составлял всего 24 ч, поскольку при более длительном инкубировании (более 48 ч) могла произойти сенсibiliзация и несенсibiliзированных иммуноцитов [12].

Оказалось, что при совместном культивировании "нормальных" тиреоцитов и лимфоцитов из ДТЗ в отсутствие FCS количество клеток через 24 ч (по показаниям экстинкции) увеличивалось в среднем на 30% (табл. 2).

Прирост количества клеток в процессе совместного культивирования "нормальных" тиреоцитов с лимфоцитами из ДТЗ происходил, очевидно, именно за счет тиреоцитов, поскольку они прикрепляются к пластику, тогда как лимфоциты при промывании лунок удаляются. При другом способе подсчета (в камере Горяева) прирост количества клеток в случае совместного инкубирования "нормальных" тиреоцитов с лимфоцитами из ДТЗ достигал 100%. При всех других вариантах эксперимента статистически значимая стимуляция роста тиреоцитов отсутствовала (см. табл. 2). Неэффективность лимфоцитов из ДТЗ в отношении роста тиреоцитов из ДТЗ может подтверждать отсутствие на последних рецепторов, опосредующих ростстимулирующие влияния внеклеточных факторов.

Среди факторов иммунной природы, способных влиять на пролиферацию тиреоцитов при ДТЗ, упоминаются тиреостимулирующие и специфические ростстимулирующие антитела [3]. Однако титры тиреостимулирующих антител не коррелируют с размерами зоба [5], а существование ростстимулирующих антител остается гипотетическим. В связи с этим индуцирующий рост тиреоцитов эффект аутореактивных лимфоцитов вызывает особый интерес.

Существование лимфоцитов, иницирующих заживление ран путем стимуляции деления клеток-мишеней при непосредственном контакте с ними, хорошо известно [1, 2]. Эти "ростстимулирующие" лимфоциты принадлежат к популяции хелперов (CD4⁺-клетки) [2]. Среди лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу при ДТЗ, также

Таблица 2

Влияние лимфоцитов на пролиферацию тиреоцитов в отсутствие FCS ($M \pm m$)

1. "Нормальные" тиреоциты	100
2. "Нормальные" тиреоциты + лимфоциты из ДТЗ*	130 ± 10 ($p < 0,05$)
3. "Нормальные" тиреоциты + "нормальные" лимфоциты*	98 ± 12
4. Тиреоциты из ДТЗ	100
5. Тиреоциты из ДТЗ + "нормальные" лимфоциты*	92 ± 16
6. Тиреоциты из ДТЗ + лимфоциты из ДТЗ*	104 ± 5

Примечание. Приведены средние данные (в процентах) об изменении экстинкции (при $D = 594$ нм) из 4 экспериментов (по 8 лунок в опыте на каждый из вариантов). * — инкубируемые совместно тиреоциты и лимфоциты были получены как от одного и того же, так и от разных пациентов.

Влияние лимфоцитов из ДТЗ на чувствительность "нормальных" тиреоцитов к ростстимулирующему эффекту FCS (по показателям экстинкции при $D = 594 \text{ нм}$) ($M \pm m$)

Клетки	Концентрация FCS		
	0%	5%	<i>p</i>
1. "Нормальные" тиреоциты	$0,077 \pm 0,005$	$0,115 \pm 0,006$	$<0,05$
2. Тиреоциты из ДТЗ	$0,081 \pm 0,003$	$0,079 \pm 0,010$	нд
3. "Нормальные" тиреоциты + лимфоциты из ДТЗ	$0,120 \pm 0,01$	$0,125 \pm 0,007$	нд
4. "Нормальные" тиреоциты + "нормальные" лимфоциты	$0,090 \pm 0,010$	$0,135 \pm 0,009$	$<0,05$

Примечание. нд — недостоверно.

преобладают CD4⁺-клетки [9]. Таким образом, возможность ростстимулирующего эффекта лимфоцитов, инфильтрирующих щитовидную железу при ДТЗ, получает дополнительное подтверждение.

Хотя индуцирующий пролиферацию клеток-мишеней эффект показан лишь для аутологических лимфоцитов [1], при аутоиммунных заболеваниях специфичность распознавания лимфоцитами клеточных антигенных детерминант может быть нарушена, и такие лимфоциты могут приобретать способность стимулировать пролиферацию и гетерологичных клеток. Известно, например, что при одном из аутоиммунных заболеваний (ТХ) цитотоксические Т-лимфоциты способны лизировать и гетерологичные тиреоциты [7]. Обнаруженное нами стимулирующее действие лимфоцитов из ДТЗ (но не из околоузловой ткани) на пролиферацию "нормальных" тиреоцитов позволяет предполагать, что некоторые популяции интратиреоидных лимфоцитов (которые в норме могли бы играть репаративную роль) при аутоиммунных поражениях щитовидной железы приобретают зобогенную активность. В последние годы показано, что тиреоциты из ДТЗ, экспрессируя лиганд "смертельного" рецептора Fas (FasL), индуцируют апоптоз инфильтрирующих железу цитотоксических Т-лимфоцитов, тем самым защищая себя от цитотоксического эффекта [10]. Поэтому среди интратиреоидных лимфоцитов при ДТЗ могут преобладать клетки с иными (в частности, с репаративными/пролиферативными) функциями.

Увеличение количества тиреоцитов, наблюдаемое при ДТЗ *in vivo*, могло бы определяться не только стимуляцией пролиферации этих клеток, но и замедлением их гибели (за счет потери рецепторов, опосредующих цитотоксическое действие комплементфиксирующих антител [3] и FasL [11]).

Высказанная нами ранее гипотеза об общем снижении количества поверхностных рецепторов тиреоцитов под действием аутореактивных лимфоцитов подтверждается индукцией последними ослабления чувствительности "нормальных" тиреоцитов к влиянию ростовых факторов FCS (табл. 3).

В табл. 3 приведены результаты одного из опытов (однотипные клетки инкубировали в 8 лунках одного и того же планшета), поскольку базальные показатели экстинкции клеток, выделенных из разных щитовидных желез, различались и, несмотря на общую закономерность, усредненные показатели (в процентах) значительно затрудняли бы восприятие полученных данных. Совместное культивирование "нормальных" тиреоцитов с лимфоцитами из ДТЗ лишает клетки щитовидной железы способности реагировать на возрастание концентрации FCS, т. е. придает им особенность, характерную для тиреоцитов из ДТЗ (см. табл. 1). Лимфоциты, изолированные из околоузловой ткани ("нормальные"), такого влияния не оказывали.

В свете полученных данных можно предположить, что в начале развития ДТЗ индуцируемая аутореактивными интратиреоидными лимфоцитами пролиферация тиреоцитов сопровождается "потерей" последними поверхностных рецепторов, опосредующих не только гибель клеток, но и ростстимулирующий эффект сывороточных факторов (что наблюдается *in vitro*). В дальнейшем, по-видимому, на тиреоцитах исчезают и рецепторы, опосредующие ростстимулирующее действие и самих

аутореактивных лимфоцитов, и основной причиной увеличения количества фолликулярных клеток щитовидной железы становится замедление их гибели, которое не успевает проявиться при кратковременной инкубации *in vitro*. Именно этим, вероятно, объясняется отсутствие ростстимулирующего действия аутореактивных лимфоцитов на тиреоциты из ДТЗ в наших опытах (см. п. 6 в табл. 2). В динамике развития ДТЗ *in vivo* "потеря" поверхностных рецепторов тиреоцитов, сопровождающаяся замедлением их гибели, становится, очевидно, основным и необходимым условием увеличения этих клеток.

Выводы

1. Тиреоциты из ДТЗ по характеру роста отличаются от "нормальных" отсутствием пролиферативного ответа, пропорционального дозе стимуляторов роста, присутствующих в FCS.
2. Лимфоциты, инфильтрирующие щитовидную железу при ДТЗ, стимулируют пролиферацию "нормальных" тиреоцитов; лимфоциты из околоузловой ткани щитовидной железы в описанных условиях опыта такого эффекта не дают.
3. Ростстимулирующее влияние лимфоцитов из ДТЗ на "нормальные" тиреоциты сопровождается потерей чувствительности последних к изменению дозы стимуляторов роста в среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева А. Г. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений. — М., 1987.
2. Донцов В. И. Лимфоидные механизмы регуляции клеточного роста: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1990.
3. Кандрор В. И. // Пробл. эндокринологии. — 1988. — № 1. — С. 34—40.
4. Кандрор В. И., Крюкова И. В., Крайнова С. И. и др. // Там же. — 1997. — № 3. — С. 25—30.
5. Крайнова С. И., Кандрор В. И. // Там же. — 1993. — № 6. — С. 46—50.
6. Свириденко Н. Ю. Иммунологические аспекты патогенеза диффузного токсического зоба и действия тиреостатической терапии: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1990.
7. Bogner U., Schleusener H. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1984. — Vol. 59. — P. 734—737.
8. Eggo M. C., Bachrach L. K., Fayet G. et al. // Mol. Cell. Endocrinol. — 1984. — Vol. 38. — P. 141—150.
9. Kawakami A., Matsuoka N., Tsuboi M. et al. // Lab. Invest. — 2000. — Vol. 80. — P. 471—484.
10. Ludgate M., Jasani B. // J. Pathol. — 1997. — Vol. 182. — P. 123—124.
11. Palazzo F. F., Hammond L. J., Goode A. W., Mirakian R. // Thyroid. — 2000. — Vol. 10. — P. 561—572.
12. Sharon J. Basic Immunology. — Baltimore, 1998.

Поступила 06.10.2000