

РАЗДЕЛ 2 ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ЗОБА

ДИБИРОВ Т.М., БАКУЕВ М.М., ШАХБАНОВ Р.К., ГУСЕЙНОВ Т.С.

FEATURES OF INDEXES OF THE PEROXIDASE OF THE THYROID GLAND AT DIFFERENT TYPES OF THE CROWS

DIBIROV TM, BAKUYEV MM, SHAKHBANOV RK, GUSEYNOV TS

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. кафедрой – профессор М.М. Бакуев) ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минобрнауки РФ, г. Махачкала

Разработанным на кафедре гистологии ДГМУ гистохимическим методом выявления активности тиреопероксидазы (ТПО) (изобретение, приоритетный номер 2015054203 от 16.12.2015) проведено исследование по определению его возможностей при установлении функционального состояния щитовидной железы (ЩЖ). Установлено что активность фермента определяются в фолликулярных тироцитах и существенно меняется при различных патологических состояниях органа. В частности, в гистохимических препаратах ЩЖ больных диффузным токсическим зобом активность ТПО в стенке фолликулов и межфолликулярных аденоматозных очагах высокая. Характерно наличие эпителиальных выпячиваний с выраженной активностью в периферических тироцитах. При заболеваниях ЩЖ в стадии эутиреоза активность фермента в фолликулярных тироцитах умеренная. Содержание фермента существенно снижено при макро- и микрофолликулярном коллоидном зобе и аутоиммунном тиреоидите в стадии гипотиреоза. Делается вывод, что результаты предлагаемого гистохимического метода определения активности ТПО позволяют дополнить морфологическое заключение патологоанатомов функциональным.

Ключевые слова: щитовидная железа, гистохимия, тиреопероксидаза

Developed at the Department of Histology DSMU histochemical method of detecting activity thyroperoxidase (TPO) (invention, foreground number 2015054203 from 16.12.2015) conducted a study to determine its capabilities when establishing a functional state of the thyroid gland (TG). It was found that the enzyme activity was determined in the follicular thyrocytes and varies considerably in various

pathological conditions the organ. In particular, in histochemical preparations thyroid patients with diffuse toxic goiter TPO activity in the wall of the follicles and foci of adenomatous interfollicular high. It is characterized by epithelial protrusion with marked activity in peripheral thyrocytes. In diseases of the thyroid gland in the stage euthyrosis enzyme activity in follicular thyrocytes moderate. The content of the enzyme significantly reduced by the macro and micro follicular colloid goiter and autoimmune thyroiditis in the stage of hypothyroidism was determined. It is concluded that the results of the proposed histochemical method for determining the activity of TPO allow pathologists to complement morphological conclusion functional.

Key words: thyroid gland, histology, thyroid peroxidase

Введение. Гормоны щитовидной железы (ЩЖ) содержат аминокислоту тирозин и атомы йода. Последние поставляются путем расщепления неорганических йодидов в цитоплазме фолликулярных клеток. В последующем эти компоненты переходят в коллоид и связываются с глобулином щитовидной железы с образованием белкового комплекса - тиреоглобулина. Далее он захватывается тироцитами путем эндоцитоза, где расщепляясь, выделяет гормон в циркуляцию [1, 6, 9, 10]. В этих процессах роль поставщика атомов йода, путем расщепления йодидов, выполняет фермент тиреопероксидаза (ТПО). Таким образом, ТПО следует считать ключевым ферментом в синтезе тиреоидных гормонов. Она синтезируется в гранулярной эндоплазматической сети и затем упакованном в эндоцитозные пузырьки виде накапливается в апикальной части тироцитов [4, 5, 11, 12].

Установлено, что ТПО встроена в апикальную мембрану фолликулярных клеток ЩЖ и катализирует перекисное окисление йода с последующим йодированием тирозина в составе тиреоглобулина [2, 8]. Считают что ТПО катализирует, как ми-

нимум, две реакции в процессе синтеза гормонов ЩЖ: йодирование тирозильных остатков тиреоглобулина и слияние йодотирозинов в процессе синтеза тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) [3, 7]. И надо считать уникальным для эндокринных желез то, что готовые гормоны в составе тиреоглобулина накапливаются во внеклеточной среде – в коллоиде, а далее, по мере необходимости поступают в циркуляцию путем эндоцитоза.

Из приведенных данных следует, что интенсивность синтеза тиреоидных гормонов в фолликулярных тиреоцитах находится в прямой зависимости от активности ТПО. Из этого положения напрашивается вывод, что по уровню активности ТПО можно судить о функциональном состоянии ЩЖ. Он важен, прежде всего, по той причине, что патоморфологическое заключение при исследовании послеоперационного материала не предполагает установления функционального состояния органа. Более того, необходимость использования предлагаемого метода больным с заболеваниями ЩЖ, которым предстоит оперативное вмешательство, рационально хотя бы потому что применяемые ныне биохимические методы определения содержания гормонов в сыворотке крови дорогостоящи и длительны по времени.

Цель исследования – установление функционального состояния ЩЖ при различных заболеваниях органа путем определения активности ТПО в тканях послеоперационного материала.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования служили кусочки тиреоидной ткани, удаленные у 82 больных с клиническим диагнозом: диффузный токсический зоб (ДТЗ) – 27, узловой эутиреоидный зоб – 13, аутоиммунный тиреоидит (АИТ) в стадии эутиреоза – 17, макро- и микрофолликулярный коллоидный зоб в стадии гипотиреоза – 11, АИТ в стадии гипотиреоза – 14. (возраст больных от 23 до 67 лет) Продолжительность заболевания колебалась от нескольких месяцев до 17 лет. Резицированную ткань не подвергая фиксации сразу переносили в морозильную камеру, а далее в камеру криостата, где готовили срезы толщиной 15-20 микрометров. Также использовали фиксированные в формалине кусочки тиреоидной ткани.

Гистохимически активность ТПО выявляли методом разработанным на кафедре гистологии ДГМА (изобретение, приоритетный номер – 2015154203, от 16.12.2015 г.) Описание метода.

Полученные срезы переносятся на предметные стекла и оставляют на открытом воздухе около 2-х часов с целью высушивания.

На предметные стекла со срезами наносится несколько капель 0,3% раствора молибдата аммония на 5 мин.

После слива предыдущего раствора на стекла наносится инкубационная среда на 15 мин.

Инкубационная среда готовится следующим образом: в бюксик наносится 1 мл насыщенного раствора бензидина и добавляют 1 каплю 0,3% раствора перекиси водорода (раствор рассчитан на 3-4 стекла).

По истечении времени инкубации, стекла с инкубационной средой переносят на столик микроскопа с фотоприставкой и сразу же делают съемки при увеличении 400. При этом в местах локализации фермента на голубоватом фоне цитоплазмы фолликулярных тиреоцитов выявляются темно-синие гранулы.

Результаты исследования и их обсуждение. В контрольных препаратах, полученных со здоровых участков послеоперационного материала у больных с узловым эутиреоидным зобом, видны фолликулы разных размеров, стенка их образована однослойным эпителием из фолликулярных тиреоцитов. Активность фермента в них умеренная; продукты реакции более выражены в апикальной части клеток. Распределение последних в различных участках стенки фолликулов неравномерное (рис.1). В межфолликулярных участках интерфолликулярные островки и новообразованные фолликулы с умеренной и высокой активностью фермента. Соединительнотканная структура в них лишена окрашенных продуктов реакции.

При больших увеличениях микроскопа можно заметить, что продукты гистохимической реакции выявляются в двух состояниях, т.е. имеет два компонента – гомогенный и гранулярный. Последний особенно четко очерчен в криостатных срезах, полученных с фиксированных формалином кусочков органа. На приведенном рисунке (рис. 1б) видно, что почти все поле зрения занято окрашенным в синий цвет гранулами, поскольку при этом клетки стенки фолликулов полностью разрушаются.

Гомогенный компонент продуктов реакции слабо заметен по причине того, что в процессе приготовления препарата он частично смывается.

При ДТЗ активность ТПО в ЩЖ высокая. Окрашенные продукты реакции выявляются в цитоплазме тиреоцитов (фолликулярных и интерфолликулярных). В стенке фолликулов распределение их неравномерное: имеются участки где фолликулярный эпителий многослойный и активность фермента в нем высокая, а в участках, где эпителий однослойный – активность умеренная (рис. 2). На приведенном рисунке обращает на себя внимание характер распределения компонентов продуктов реакции: в апикальной части клеток локализован преимущественно гранулярный, а в околоядерной зоне – гомогенный.

Во многих фолликулах просматриваются

признаки усиленной пролиферации; в их полость вдаются интерфолликулярные сосочки, которые сочетаются с экстрафолликулярными эпителиальными выпячиваниями. Между крупными фолликулами много вновь формирующихся мелких с высокой и очень высокой активностью фермента. Ядра тиреоцитов, а также межфолликулярные соединительнотканые структуры четко очерчены в виде просветленных участков по причине отсутствия в них продуктов реакции.

У больных узловым эутиреоидным зобом при постановке реакции на ТПО в препаратах выявляются многочисленные аденоматозные очаги с умеренной и высокой активностью фермента. (рис. 3). Часть очагов содержит сформированные мелкие фолликулы. В их стенке активность умеренная; нередко выявляются экстрафолликулярные сосочки с многослойным фолликулярным эпителием. Активность фермента в стенке сформированных фолликулов умеренная или высокая; распределение продуктов реакции в них неравномерное. Четко очерчены межфолликулярные соединительнотканые прослойки без окрашенных продуктов реакции.

В послеоперационном материале ЩЖ больных АИТ в стадии эутиреоза при постановке реакции на ТПО в препаратах выявляются фолликулы разных размеров с умеренной активностью фермента. Стенка фолликулов местами многослойная - признак пролиферативной активности. Распределение продуктов реакции в различных участках фолликулов неравномерное. В межфолликулярных пространствах множественные аденоматозные и паренхиматозные очаги с умеренной или высокой активностью. Соединительнотканые прослойки расширены; в них многочисленные лимфоцитарные инфильтраты без окрашенных продуктов реакции.

В этом варианте патологии ЩЖ следует считать характерным то, что наряду с наличием указанных крупных межфолликулярных инфильтратов, слабая очерченность границ фолликулярных клеток, по-видимому, связанная с выраженностью процесса их разрушения (рис. 3).

При постановке реакции на ТПО в препаратах ЩЖ больных макро-микрофолликулярным коллоидным зобом в стадии гипотиреоза выявляются фолликулы преимущественно крупных размеров с малым содержанием, или полным отсутствием продуктов гистохимической реакции. В стенке фолликулов слабо очерченный однослойный уплощенный эпителий. При общем обзоре препаратов просматривается закономерность, чем больше размеры фолликулов, тем меньше в клетках их стенки окрашенного материала (рис. 4).

В стенке ряда фолликулов среднего и малого размера просматривается многослойный

эпителий со следами окрашенного материала, а в межфолликулярных пространствах – аденоматозные очаги из интерфолликулярных тиреоцитов со слабой и умеренной активностью фермента.

При постановке реакции на ТПО в ЩЖ больных АИТ в стадии гипотиреоза средней степени тяжести большая часть поля зрения занята крупными лимфоцитарными инфильтратами (рис. 4). Между ними единичные фолликулы малых размеров с умеренной или слабой активностью фермента. Отдельные аденоматозные очаги, без видимого просвета, содержат малое количество окрашенных продуктов реакции, а в случаях тяжелого течения процесса выявляются только их следы.

Таким образом, во всех случаях заболеваний ЩЖ с синдромом тиреотоксикоза активность фермента высокая. Однако сравнение данного показателя с результатами функциональных исследований органа (определение содержания ТЗ и Т4) малоинформативно по причине того, что в преобладающем большинстве случаев больные исследуются на фоне медикаментозной терапии, снижающее содержание гормонов в циркуляции. Поэтому, в случаях оперативного лечения больных, значимость гистохимического исследования ЩЖ существенна, поскольку позволяет объективно оценить функциональное состояние органа.

При гистохимическом исследовании послеоперационного материала, взятого у больных макро- и микрофолликулярным коллоидным зобом, в препаратах выявляются фолликулы преимущественно крупных размеров с малым содержанием, или полным отсутствием продуктов реакции. В стенке фолликулов слабо очерченный однослойный уплощенный эпителий. Как было отмечено, просматривается закономерность – чем больше размеры фолликулов, тем меньше в клетках их стенки окрашенного гистохимического материала. В межфолликулярных пространствах аденоматозные очаги, по-видимому, признаки ранней пролиферативной активности, также со слабой активностью фермента. Слабая активность ТПО просматривается и в участках стенки фолликулов, где тиреоидный эпителий многослойный. И надо полагать, что указанные особенности количественного содержания и распределения продуктов реакции являются признаками истощения функциональных возможностей ЩЖ, т.е. выраженного гипотиреоза.

Выводы:

В ЩЖ активность ТПО выявляется в цитоплазме фолликулярных клеток в двух состояниях – гомогенном и гранулярном; последний компонент локализован преимущественно в апикальной части клеток.

У больных ДТЗ с выраженным синдромом

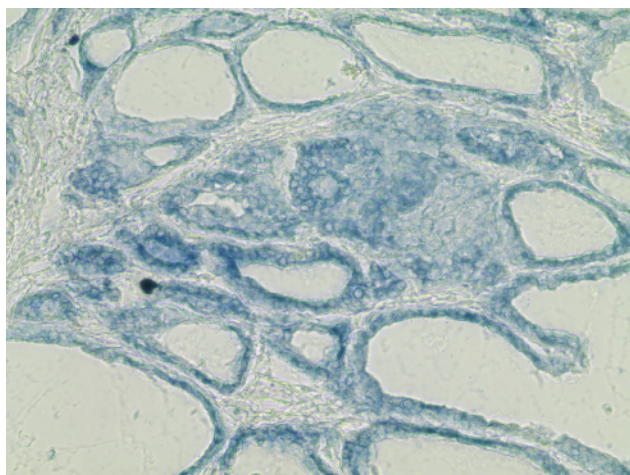


Рис. 1а.

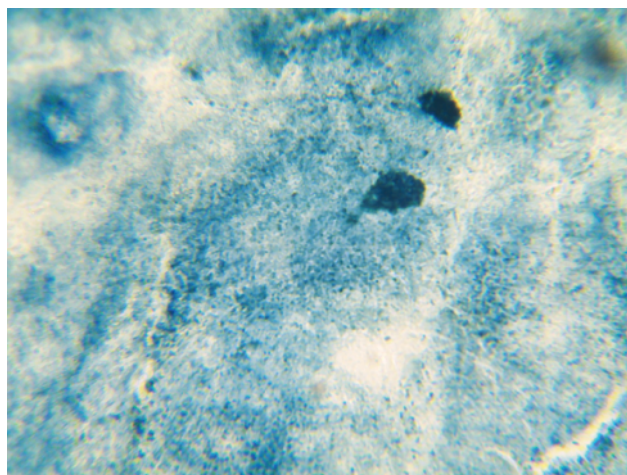


Рис. 1б.

Рис. 1. Щитовидная железа. Реакция на ТПО. Распределение продуктов реакции в норме: а) криостатный срез с нефиксированного кусочка органа; активность фермента в стенке фолликулов и интерфолликулярных островках умеренная или выраженная, б) криостатный срез с фиксированного кусочка; фолликулярные тиреоциты разрушены; в поле зрения в основном гранулярный компонент фермента. Ув. 400.

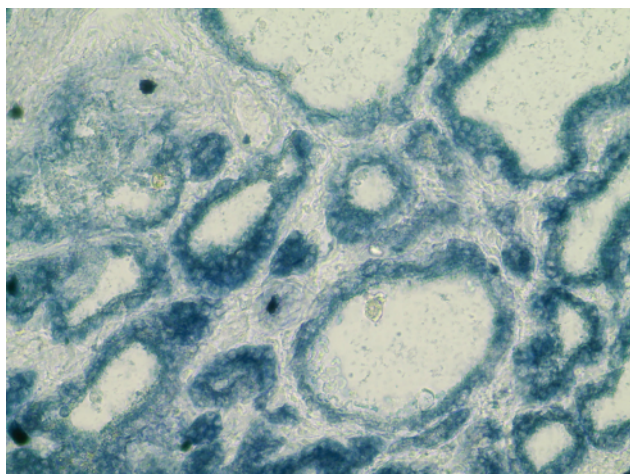


Рис. 2а.

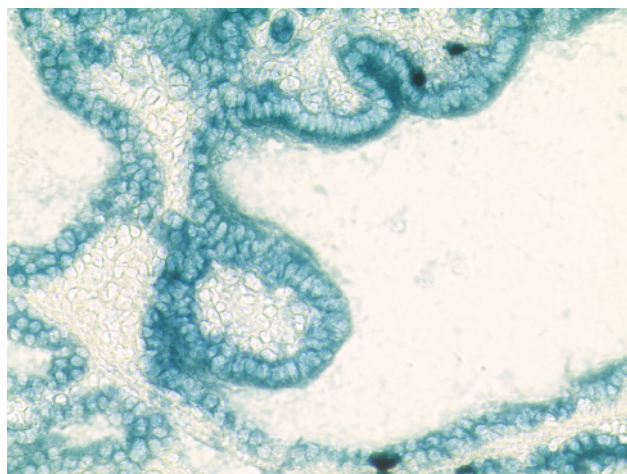


Рис. 2б.

Рис. 2. Щитовидная железа больных ДТЗ тяжелой степени (а) и средней степени (б) тяжести. Реакция на ТПО а) отдельные участки стенки фолликулов многослойны; в соединительнотканых прослойках вновь сформированные мелкие фолликулы и интерфолликулярные островки с высокой активностью фермента, б) в стенке фолликулов экстра – и интрафолликулярные выпячивания. Ув. 400.

тиреотоксикоза активность фермента высокая и определяется в тиреоцитах стенки фолликулов и межфолликулярных аденоматозных очагов.

При АИТ в стадии эутиреоза умеренное содержание продуктов гистохимической реакции определяется в паренхиматозных и аденоматозных очагах, а также в стенке мелких фолликулов.

В стадии гипотиреоза АИТ незначительное количество аденоматозных очагов и малых фолликулов, которые располагаются между крупными

скоплениями лимфоидной ткани, содержат лишь следы продуктов гистохимической реакции.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бондаренко Н.С., Зубова Ю.О., Сапронова А.Я. и др. Роль аденогипофизотропных нейрогормонов в эндокринной парааденогипофизарной регуляции периферических органов – мишеней в онтогенезе у крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2015. №3. с.268-272.

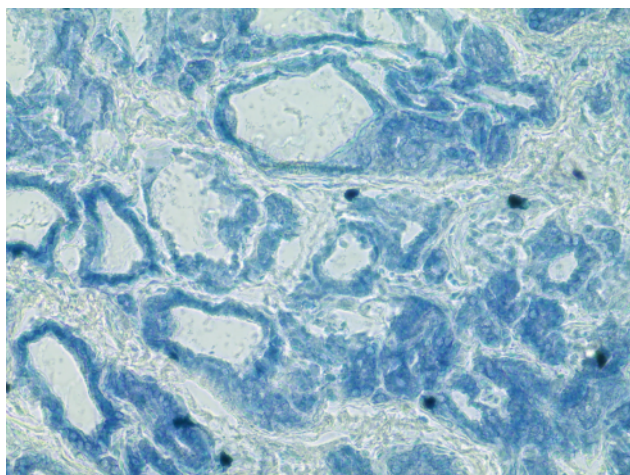


Рис. 3а.

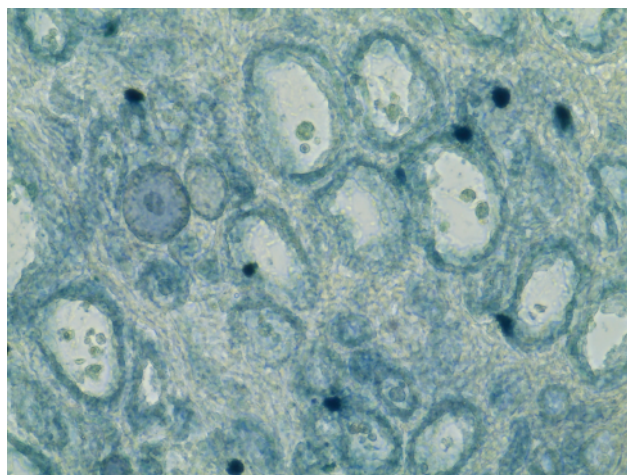


Рис. 3б.

Рис. 3. Щитовидная железа больных узловым эутиреоидным зобом (а) и АИТ в стадии эутиреоза (б). Реакция на ТПО: а) многочисленные аденоматозные очаги с умеренной и высокой активностью, б) в межфолликулярных пространствах лимфоцитарные скопления. Ув. 400.

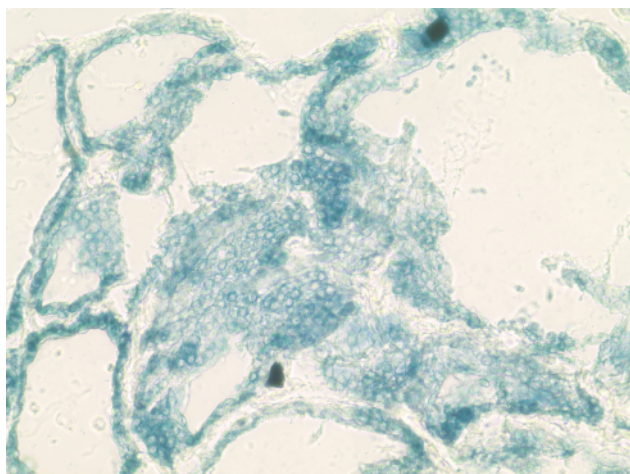


Рис. 4а.

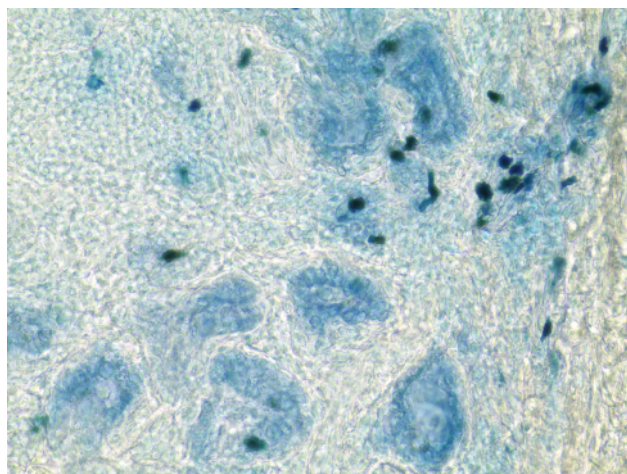


Рис. 4б.

Рис. 4. Щитовидная железа больных макро – и микрофолликулярным коллоидным зобом (а) и АИТ в стадии гипотиреоза. Реакция на ТПО: а) фолликулы разных размеров со слабой активностью фермента, б) единичные аденоматозные очаги, между которыми крупные лимфоцитарные скопления. Ув. 400.

2.Верещагина Г.В., Харченко Н.Г. Способ определения недостаточности трийодтиронина в организме / Открытие. 1985. А.С.№1153292 СССР. №29. с.26.

3.Городетская И.В., Гусакова Е.А. Влияние тиреоидного статуса на систему протеиназы (ингибиторы при стрессе) // Биомед. Химия. 2015. т.61. вып.3. с.389-393.

4.Кузмина Н.С., Кириллова Г.А., Зубков А.В. и др. Перекрестная активность моноклональных

антител и аутоантител человека к пероксидазе щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. 2006. т.8. № 2-3. с.228.

5.Кочетков А.Г., Безденежных А.В., Силин Е.В. Степень йодирования коллоида щитовидной железы как показатель уровня работоспособности // Арх. анат., гистол. и эмбриол. 2001. т.119. №2.с.45-47.

6.Туракулов Я.Х., Ташходжаева Т.П., Артыкбаева Г.М. Активность конверсии тироксина в трийод-

тиронин в печени и почках // *Морфология*. 1991. №5. с.44-45.

7. Шахтарин В.В., Петрова Г.А., Гекин С.Ю., Симанова Г.М. Новые подходы количественной оценки метаболизма трийодтиронина в организме // *Пробл. Эндокринологии*. 2000. №1. с.34-37.

8. Шпаков А.О. Новые достижения в разработке и изучении механизма действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов // *Цитология*. 2015. т.57. №3. с. 167-177.

9. Шрейбер В. Патофизиология желез внутренней секреции / Прага. 1987. с. 190-192; 193; 200-201; 215-219.

10. Deme D. // *Biochemical Journal*. 1994. 301:75.

11. Nakamura V. et al. *Biochemistry*. 1991; 30: 4880.

12. Walter F. PhD. *Medical Physiology: A. Cellular And Molecular Approach*. – Elsevier/Sanders. 2003- P. 1300.

Авторская справка:

1. Дибиров Тагир Муратович - аспирант кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ

ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минобр-науки РФ., г. Махачкала, ул. Шамсулы Алиева 1, тел. 89289890055, E-mail: dibirovtagir@mail.ru

2. Бакуев Максудин Маккидинович - заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минобрнауки РФ, г. Махачкала, ул. Шамсулы Алиева 1, тел. 89634029528.

3. Шахбанов Руслан Казбекович – доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, кандидат медицинских наук, ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минобрнауки РФ, г. Махачкала, ул. Шамсулы Алиева 1, тел. 89604195222.

4. Гусейнов Тагир Сайдуллахович - заведующий кафедрой анатомии человека, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минобрнауки РФ., г. Махачкала, ул. Шамсулы Алиева 1, тел. 89285559000.