# ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЭКСПРЕССИИ РЯДА АНТИГЕНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ПОСЛЕ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРИ

Чаиркин И.Н.[1], Чаиркина Н.В.[1], Юняшина Ю.В.[1], Чекушкин А.А.[2], Мозеров С.А.[3], Мялин А.Н.[4]

# CHANGE IN THE IMMUNOEXPRESSION OF THE NUMBER ANTIGENS OF THE THYROID GLAND AFTER 24 HOURS THE ACUTE BLOOD LOSS

Chairkin I.N., Chairkina N.V., Yunyashina Y.V., Chekushkin A.A., Mozerov S.A., Myalin A.N.

*[1]Кафедра нормальная анатомии с курсами судебной медицины, оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. кафедрой - профессор И.Н. Чаиркин) Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Огарёва Н.П., г. Саранск; [2]кафедра клинической морфологии и судебной медицины с курсом онкологии (руководитель - доцент А.С. Купрюшин) Медицинский институт ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», г. Пенза; [3]кафедра морфологии (зав. кафедрой - д.м.н. С.А. Мозеров), [4]кафедра анатомии (зав. кафедрой - доцент А.Н. Мялин) Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ ИАТЭ г. Москвы, Медицинский факультет, г. Обнинск.*

Экспериментально установлено, что через 24 часа после острой кровопотери происходят изменения в экспрессии иммуногистохимических маркеров, характеризующих эпителиальный и стромальный компоненты щитовидной железы в сравнении с контрольной группой животных.

**Ключевые слова:** *иммуногистохимические маркеры, щитовидная железа, коллоид, тиреоглобулин, виментин, цитокератины.*

Experimentally established that during the first day after acute blood loss occurs morphological changes in the expression of immunohistochemical markers that characterize the epithelial and stromal components of thyroid gland compared to control animals.

**Key words:** *immunohistochemical markers , thyroid, colloid, thyroglobulin , vimentin , cytokeratins.*

**Введение.** Кровопотеря представляет собой комплекс компенсаторных и патологических реакций, возникающих в ответ на кровотечение [1]. Острая кровопотеря является причиной развития тяжелых и опасных для жизни патологических процессов и одной из наиболее частых причин развития критических состояний. В настоящее время в связи с развитием научно-технического прогресса и автоматизацией производства произошло снижение промышленного травматизма. Но, тем не менее, увеличение количества дорожно-транспортных происшествий, непрекращающиеся военные конфликты обуславливают большое количество травм, в том числе и среди мирного населения, как правило, сопровождающихся значительными кровопотерями.

И, несмотря на значительные успехи современной медицины в области трансфузионной терапии, сосудистой хирургии, гемотрансфузии и реаниматологии, острая кровопотеря остается одной из ведущих причин гибели лиц в возрасте от 5 до 44 лет. В общей структуре на долю летальных исходов от некомпенсированной кровопотери приходится около 10 % случаев, и существенной тенденции к снижению не наблюдается, несмотря на использование в практике принципиально новых средств и методов терапии [2].

В настоящее время возрастает интерес к изучению механизмов повреждения и структурной перестройке органов эндокринной системы, вызванных различными патологическими агентами - физическими, химическими, лекарственными факторами [3].

Адаптационные реакции при острой кровопотере до сих пор недостаточно исследованы. В связи с этим, нам представляется целесообразным изучение воздействия острой кровопотери на щитовидную железу – орган, играющий важную роль в функциональном статусе эндокринной системы, обладающий широким диапазоном гормональных влияний на различные органы и системы. Изменение функциональной активности щитовидной железы приводит к развитию гормонального дисбаланса, что отражается на течении физиологических процессов, внутриклеточном метаболизме органов-мишеней, процессах адаптации.

**Цель исследования -** изучить щитовидную железу экспериментальных животных через 24-е часа после острой кровопотери в сравнении с контрольной группой животных с применением ряда антигенов – иммуногистохимических маркеров, характеризующих эпителиальный (тиреоциты) и стромальный компоненты (сосудистое русло, коллагеновые волокна, нервные волокна,

воспалительная инфильтрация).

**Материал и методы исследования.** Для изучения морфофункционального состояния щитовидной железы в первые сутки после острой кровопотери выполнен эксперимент на 20 взрослых беспородных собаках-самцах массой от 10 до 23 кг. Исследование осуществлялось в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13.11.84 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальным животных». Опыты проводили под внутриплевральным тиопентал-натриевым (0,04 г/кг) наркозом. После проведения подготовительных мероприятий осуществляли свободное кровопускание из правой бедренной артерии в объеме 22,83 ± 0,24 мл/кг. Продолжительность кровопускания составляла 3,87 ± 0,20 мин. У животных, выводившихся из эксперимента через 24 часа путем передозировки хлороформа, вводившимся ингаляционным путем, забирали аутопсийный материал сразу же после констатации признаков смерти.

Аутопсийный материал мы подвергали фиксации в 10-% нейтральном формалине с последующей стандартной гистологической проводкой и заливкой в парафин. Визуализацию проводили с помощью системы визуализации EnVisionÔ (производства DAKO, Дания). Изготовленные парафиновые срезы (5 мкм) подвергали депарафинизации и обезвоживанию по стандартной гистологической методике. После этого следовали рекомендациям фирмы производителя в выборе рабочего разведения и последующем проведении иммуногистохимического исследования. Система основана на действии полимеров, меченых пероксидазой хрена, которая связана с вторичными антителами. Эндогенная пероксидазная активность погашается инкубацией образца в течение нескольких минут специальным ферментным блоком. Затем образец инкубируется с первичными мышиными/кроличьими антителами в определенном разведении с последующей инкубацией с HRP-коньюгированным декстрановым полимером. Реакция визуализируется с помощью DAB+ хромогена. Позже образец инкубируется с

**Таблица.**

**Результаты изучения иммуноэкспрессии различных маркеров**

| Маркеры | Тиреоциты | Коллоид | Кровеносные сосуды | | Коллагеновые волокна стромы | Нервные окончания | Элементы воспаления |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | эндотелий | миоциты | | | |
| Опытный образец | | | | | | | |
| AE1/AE3 | +++ | +/- | - | - | - | - | - |
| Vim | - | - | +++ | +++ | + | - | - |
| FVIII | - | - | - | - | - | - | - |
| CD31 | - | - | - | - | - | - | - |
| CD34 | - | +/- | - | - | - | - | - |
| Tg | +++ | +++ | - | - | - | - | - |
| Cal | - | - | - | - | - | - | - |
| Chr A | + | - | - | - | - | - | - |
| Synap | ++ очаги | - | - | - | - | - | - |
| NSE | +++ | - | - | - | - | - | - |
| Контрольный образец | | | | | | | |
| AE1/AE3 | +++ | - | - | - | - | - | - |
| Vim | - | - | + | + | - | - | - |
| FVIII | - | - | - | - | - | - | - |
| CD31 | - | - | - | - | - | - | - |
| CD34 | - | - | - | - | - | - | - |
| Tg | - | +/- | - | - | - | - | - |
| Cal | - | - | - | - | - | - | - |
| Chr A | - | - | - | - | - | - | - |
| Synap | ++ очаги | - | - | - | - | - | - |
| NSE | ++ очаги | - | - | - | - | - | - |

оптимально разведенными мышиными/кроличьими антителами и AP-реагентом. Для повторной визуализации используется перманентным красным хромогеном (E. Dako, 2006). Для достоверности полученных результатов применяли позитивные и негативные контроли антигенов, а так же негативные контроли антител [4].

Всего исследовано 20 срезов ткани щитовидной железы (1 опытный и 1 контрольный случай), окрашенных с помощью иммуногистохимического метода EnVisionâ+System. Система EnVision предназначена для идентификации антигенов при световой микроскопии в нормальных и патологически измененных тканях, залитых в парафин, в криостатных срезах или клеточных препаратах. Она позволяет усилить интенсивность окраски «слабых» антигенов. Использованы первичные антитела к следующим маркерам: цитокератины широкого спектра AE1/AE3, виментин, фактор Виллебрандта FVIII, CD31, CD34, тиреоглобулин, кальцитонин, паратгормон, хромогранин А, синаптофизин, нейронспецифическая энолаза.

Метод иммуногистохимии основан на выявлении комплексов антиген-антитело на гистологических срезах тканей. Данный метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомых веществ, основан на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном.

Щитовидная железа была исследована с применением маркеров, характеризующих эпителиальный (тиреоциты) и стромальный компоненты (сосудистое русло, коолагеновые волокна, нервные волокна, воспалительная инфильтрация).

Полученные результаты. Результаты изучения иммуноэкспрессии различных маркеров представлены в таблице (табл.).

Определение экспрессии клетками и компонентами стромы маркеров проводили с учетом интенсивности реакции.

Интенсивность реакции оценивали по следующим параметрам: 1) реакция отсутствует «-»; 2) слабая реакция «+»; 3) умеренная реакция «++»; 4) выраженная реакция «+++».

Выявлены различия между опытными и контрольными образцами в характере экспрессии тиреоглобулина. Тиреоглобулин продуцируется тироцитами и секретируется в просвет фолликулов щитовидной железы. Он представляет собой гликозилированный димерный белок и выполняет функцию связывания.

Ткань щитовидной железы в опытном образце характеризовалась диффузной выраженной экспрессией указанного маркера - в тиреоцитах и коллоиде (рис. 1).

В контрольном образце обнаружена лишь слабопозитивная реакция коллоида, а тиреоциты оставались практически негативными (рис. 2).

Также в экспериментальных образцах была выявлена более выраженная экспрессия виментина по сравнению с образцами у интактных животных. Виментин является белком цитоскелета различных типов клеток, таких как клетки мезенхимы и эндотелия, фибробласты, хондроциты и остеоциты. Он используется в качестве маркера опухолей мягких тканей. Виментин - широко распространенный в организме цитруллинированный белок, который синтезируется и модифицируется макрофагами под регуляцией провоспалительных и воспалительных цитокинов. Его высвобождение в процессе апоптоза и некроза незначительно влияет на внеклеточную концентрацию. По данным литературы в тканях щитовидной железы только стромальные клетки и внутрипротоковые макрофаги реагируют с антителами к виментину [5].

Строма щитовидной железы в опытных образцах имела выраженную экспрессию виментина в клетках эндотелия кровеносных сосудов, в миоцитах tunica media кровеносных сосудов, а также в коллагеновых волокнах (рис. 3).

Островки тироцитов, располагающиеся между фолликулами были окружены тонкой сетью капилляров со слабопозитивным окрашиванием. В контрольном образце обнаружена лишь слабопозитивная реакция стромы щитовидной железы.

Цитокератины – белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. Цитокератины представляют собой семейство структурных белков эпителиальных клеток, которые экспрессируются в соответствии с типом эпителия. Что касается щитовидной железы, то ее фолликулярные клетки показывают активную реакцию со спектром антикератиновых антител, однако реакция на антитела к эпидермальному прекератину встречается лишь в единичных случаях [6].

В контрольных и опытных образцах ткани щитовидной железы были установлены очаги эпителиальных клеток фолликулярного происхождения, которые экспрессировали цитокератины широкого спектра/. В экспериментальном образце также обнаружена слабопозитивная реакция коллоида на цитокератин (рис. 4).

В контрольных и опытных образцах ткани щитовидной железы были установлены очаги эпителиальных клеток фолликулярного (вероятно, не парафолликулярного) происхождения, которые экспрессировали нейронспецифическую энолазу. Она представляет собой одну из структурных разновидностей фермента энолазы, необходимого для гликолиза [7]. NSE в норме встречается

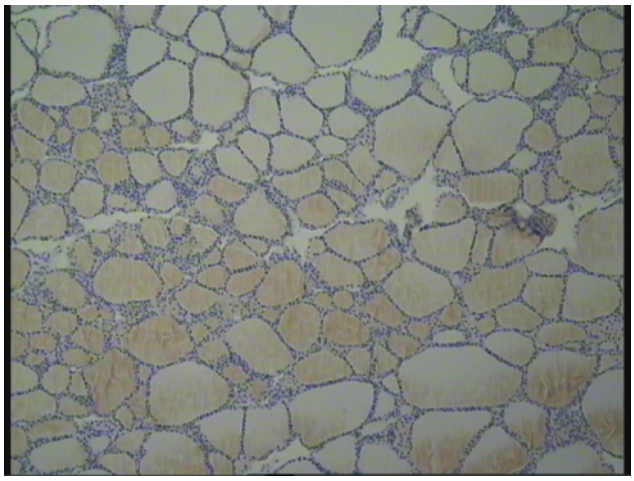

**Рис. 1.** Экспрессия тиреоглобулина в фолликулярных тиреоцитах и коллоиде при геморрагическом шоке. 24 часа после острой кровопотери. Ув. 100

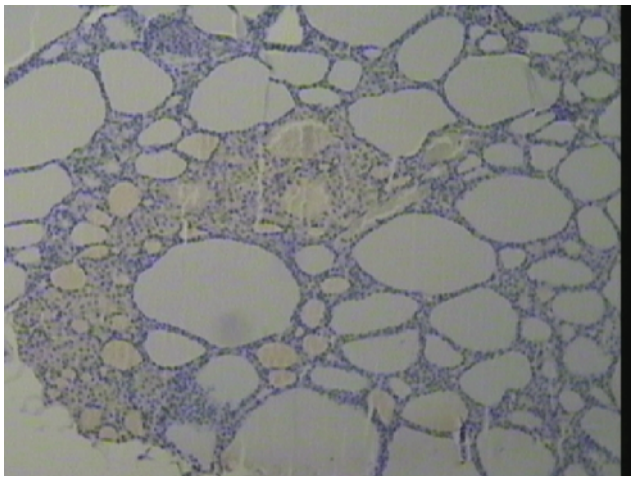

**Рис. 2.** Экспрессия тиреоглобулина в щитовидной железе интактных животных. Ув. 100

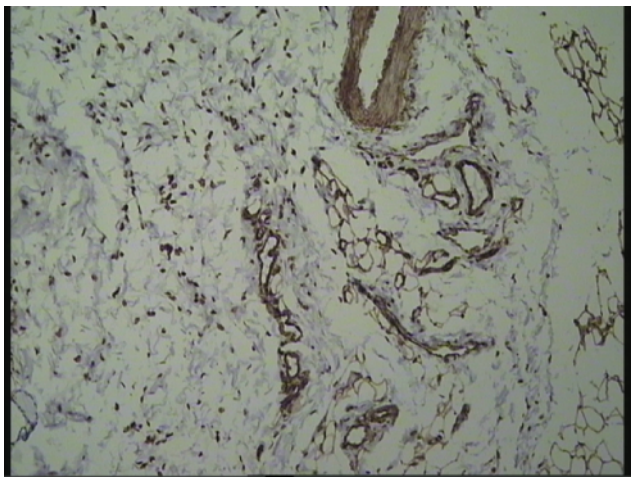

**Рис. 3.** Экспрессия виментина в строме щитовидной железы при геморрагическом шоке. 24 часа после острой кровопотери. Ув. 100

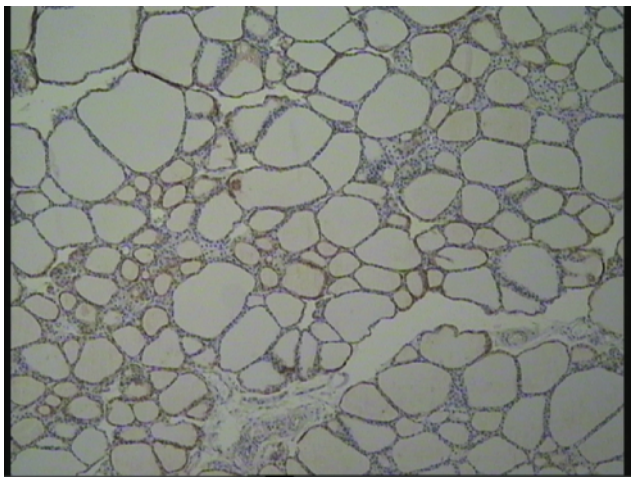

**Рис. 4.** Экспрессия цитокератина тиреоцитами и коллоидом фолликулов щитовидной железы при геморрагическом шоке. 24 часа после острой кровопотери. Ув. 100

в клетках нейроэндокринного происхождения, в частности, в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников и парафолликулярных клетках щитовидной железы [8].

Те же группы клеток в серийных срезах не демонстрировали реакции с антителами к кальцитонину. Вероятно, данные группы клеток обладают способностью к секреции указанных продуктов, но биологическое предназначение этих клеток в ткани щитовидной железы предстоит еще установить.

Выводы. Таким образом, экспериментально установлено, что через 24 часа после острой кровопотери происходят изменения в экспрессии иммуногистохимических маркеров, характеризующих эпителиальный и стромальный компоненты щитовидной железы в сравнении с контрольной группой животных. В частности, выявлены различия в интенсивности реакции и характере экспрессии тиреоглобулина. Ткань щитовидной железы в через 24 часа после острой кровопотери характеризовалась диффузной выраженной экспрессией указанного маркера - в тиреоцитах и коллоиде. В контрольном образце обнаружена лишь слабопозитивная реакция коллоида, а тиреоциты оставались практически негативными. Также выявлены изменения экспрессии виментина стромальными компонентами щитовидной железы. Строма щитовидной железы в опытных образцах

имела выраженную экспрессию виментина в клетках эндотелия кровеносных сосудов, в миоцитах средней оболочки средних и мелких артерий, а также в коллагеновых волокнах. В контрольном образце обнаруживалась лишь слабопозитивная реакция стромы щитовидной железы

*ЛИТЕРАТУРА:*

*1. Krug E. G., Sharma G. K., Lozano R. // Am. J. Publ. Hlth. — 2000. — Vol. 90. — P. 523—526*

*2. Козиев М.П. Значение адаптивных реакций при острой кровопотере для определения тактики инфузионной терапии на догоспитальном этапе: диссертация … кандидата медицинских наук ( 14.00.37). - Новосибирск, 2009.- 95 с.*

*3. Полякова Л.В. Патоморфология щитовидной железы при хроническом эндотоксикозе / Л.В. Полякова //дисс. канд. мед. наук. – Волгоград, 2008.*

*4. Петров, С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань, 2004. – 456 с.*

*5. Miettinen M., Franssila K., Lehto V. P., Paasivuo R., Virtanen I. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors // Lab Invest. -- 1984. -- Mar. -- T. 50, № 3. -- C. 262-70.*

*6.Lam K. Y., Lui M. C., Lo C. Y. Cytokeratin expression profiles in thyroid carcinomas // Eur J Surg Oncol. -- 2001. -- Nov. -- T. 27, № 7. -- C. 631-5.*

*7.Huntgeburth M., Adler C., Rosenkranz S., Zobel C., Haupt W. F., Dohmen C., Reuter H. Changes in Neuron-Specific Enolase are More Suitable Than Its Absolute Serum Levels for the Prediction of Neurologic Outcome in Hypothermia-Treated Patients with Out-of-Hospital Cardiac Arrest // Neurocrit Care. -- 2013. -- Jul 9.*

*8.Goto J., Otsuka F., Kodera R., Miyoshi T., Kinomura M., Otani H., Mimura Y., Ogura T., Yanai H., Nasu Y., Makino H. A rare tumor in the adrenal region: neuron-specific enolase (NSE)-producing leiomyosarcoma in an elderly hypertensive patient // Endocr J. -- 2008. -- Mar. -- T. 55, № 1. -- C. 175-81.*

**Авторская справка:**

Чаиркин Иван Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой «Нормальная анатомия с курсами судебной медицины и оперативной хирургии и топографической анатомии» Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Огарева Н.П., 430027 г. Саранск, ул. Комарова, д. 15, кв. 43, 89271727213, e-mail: chairkin@rambler.ru

Чаиркина Наталья Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Патология с курсом патологической физиологии» Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Огарева Н.П., 430027 г. Саранск, ул. Комарова, д. 15, кв. 43

Юняшина Юлия Владимировна – ассистент кафедры «Нормальная анатомия с курсами судебной медицины и оперативной хирургии и топографической анатомии» Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Огарева Н.П., аспирант кафедры «Нормальная анатомия с курсами судебной медицины и оперативной хирургии и топографической анатомии», 440066 г. Пенза, ул. Глазунова, 1-35, 89273794947, e-mail: yuniaschina@yandex.ru

Чекушкин Александр Александрович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Клиническая морфология и судебная медицина с курсом онкологии» медицинского института Пензенского государственного университета, 440026 г. Пенза, ул. Красная, д. 40, 89273754547, e-mail: chekushkinaa@mail.ru

Мозеров Сергей Алексеевич – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой морфологии медицинского факультета Национального исследовательского ядерного университета МИФИ ИАТЭ г. Москвы, 249040 г. Обнинск, ул Студенческий городок д.1, e-mail: mozerov@list.ru, 89056422329

Мялин Александр Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент заведующий кафедрой анатомии человека медицинского факультета Национального исследовательского ядерного университета МИФИ ИАТЭ г. Москвы, 249040 г. Обнинск, ул Студенческий городок д.1, e-mail: alexmyalin@mail.ru, 89307517812.