

УДК 61:612.017:615.371

ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАН ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО- ГО ГІПОТИРЕОЗУ

Кучма І.Ю., Симиренко Л.Л., Никитченко Ю.В.,
Волянський А.Ю., Цейтлін Н.А.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова АМН України»,

Гормональна регуляція функцій імунної системи здійснюється в значній мірі через систему гіпоталамус-гіпофіз-кора наднирників та гіпоталамус-гіпофіз-щитоподібна залоза. Глюкокортикоїди регулюють експресію цитокінів, адгезивних молекул, хемоатрактантів, а також впливають на міграцію, дозрівання й диференціацію імунних клітин. Тиреоїдні гормони необхідні для нормального розвитку В-лімфоцитів і впливають на гуморальну імунну реакцію. Показано, що тиреоїдні гормони мають важливий прямий та зворотній стимулюючі ефекти на сироваткові маркери клітинної імунної реакції, що полягають в збільшенні рівнів IL-18 та si-2R сироватки із супутнім зростанням NK-клітин у периферичній крові [1]. Інтегральний аналіз ролі системи гіпоталамус-гіпофіз-щитоподібна залоза в активації Т й В лімфоцитів *in vivo* показав участь внутрішньоклітинного сигналіngu протеїнкінази С у модуляції тиреоїдними гормонами мітогеніндукованої проліферації лімфоцитів у гіпо(навантаження пропілтіоурацилом) і гіпертиреїдних (введення тироксину) мишей [2].

Відзначено [3, 4], що ефекти тиреоїдних гормонів на імунну систему досліджено значно менше, ніж ефекти гормонів осі гіпоталамус-гіпофіз-наднирники. Порушення функції щитоподібної залози змінюють імунний статус організму. Саме гіпотиреоїдний стан чинить негативний біологічний вплив на здатність організму в цілому генерувати потужну імунну реакцію, що ставить під загрозу ефективність вакцинації населення. Визначення резервів імуногенезу з метою підвищення ефективності вакцинацій включає дослідження особливостей імуногормональних взаємозв'язків у динаміці формування імунної відповіді.

Нами проведено дослідження особливостей тиреоїдного стану щурів за умов експериментального гіпотиреозу. Для розвитку гіпотиреозу був обраний 1-метил-2-меркаптоїмідазол (ММІ), як анти-тиреоїдний препарат, який звичайно використовують в людини при лікуванні гіпертиреозу. Більш агресивне лікування, таке як хірургічна або I^{131} -викликана тиреоїдектомія ушкоджує також і імунну функцію [5] причому остання є також генотоксичною для лімфоцитів [6].

Мета дослідження – вивчити особливості гормональної ланки регуляції імуногенезу за умов гіпотиреоїдного стану організму в експерименті для

подальшого їх використання при вдосконаленні критеріїв оцінки процесу вакцинації.

Матеріали та методи

Експеримент проводили на чотирьох групах 3-місячних самців щурів лінії Wistar. Гіпотиреоїдний стан викликали введенням внутрішньочеревно один раз на добу ММІ в дозі 1,0 мг на 100 г маси тіла, щурам першої групи (контрольна група, 7 особин) протягом 10 днів, другої та третьої груп (по 15 особин в кожній) - протягом всього експерименту (38 днів). Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин внутрішньочеревно один раз на добу в об'ємі 0,25 мл на 100 г маси тіла. Тварини другої групи були групою контролю гіпотиреоїдного стану організму протягом експерименту (група порівняння). Щурів третьої групи на десятю добу після первинного введення ММІ та щурів четвертої групи, що знаходилися у еутиреоїдному стані (15 особин), імунізували АДП-анатоксином. Вакцину вводили підшкірно одноразово в дозі 15 ЛФ дифтерійного й 5 ОЗ правцевого анатоксинів в 0,25 мл препарату. Цю дозу, як мінімально ефективну, було визначено при розробці моделі імунної відповіді на АДП-анатоксин [7]. Щурів виводили з досліду шляхом декапітації під легким ефірним наркозом на 10 добу після введення фізіологічного розчину (перша група) та на 3, 7, 14, 21 й 28 добу після імунізації (2-4 групи). Одержували сироватку крові та зберігали її на холоді до використання у досліді. При проведенні досліджень дотримувалися рекомендацій Європейської конвенції з питань етики по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) [8].

Антитіла (АТ) до дифтерійного та правцевого анатоксинів АДП-вакцини визначали у сироватці крові в реакції пасивної гемаглютинації за допомогою стандартного комерційного "Діагностикума еритроцитарного дифтерійного антигенного рідкого" (з активністю 1:3200) та "Діагностикума еритроцитарного правцевого антигенного рідкого" (з активністю 1:1280, 1:2800), виготовлених АОБТ "Біомед" ім. І.І. Мечникова. Концентрацію тироксину та трийодотироніну визначали радіоімунологічним методом з використанням стандартних наборів реактивів "Total T4 RIA", "Total T3 RIA" виробництва Immunotech (Чеська республіка) та установки для радіоімунохімічних досліджень "Наркотест". Розрахунки концентрації гормональних показників виконували з використанням комп'ютерної програми «Наркотест». Статистичну обробку результатів дослідження виконували методами описувальної статистики та регресійного аналізу з використанням пакету прикладних програм "Excel" та "Statistika V. 6".

Результати та обговорення

Гіпотиреоїдний стан експериментальних тварин оцінювали за змінами фізіологічних показників та стану тиреоїдної системи організму. Введення щурам 1-метил-2-меркаптоїмідазолу протягом 10 днів супроводжувалося зменшенням маси тіла на 15,5 %,

маси серця - на 23,5 % ($P \leq 0,05$). Масовий коефіцієнт серця знижувався на 9,2 % ($P \leq 0,05$), а ректальна температура тіла - на 0,9° ($P \leq 0,05$), (таблиця 1). Під впливом ММІ відбувалося зниження тиреоїдного статусу організму (таблиця 2).

Таблиця 1. Показники фізіологічного стану щурів за умов введення 1-метил-2-меркаптоїмідазолу протягом 10 діб, (M ± m)

Показник	Еутиреоїдні щури	Гіпотиреоїдні щури
Маса тіла, г (а)	233 ± 50	197 ± 10
Маса серця, г (в)	0,763 ± 0,018	0,584 ± 0,036*
Масовий коефіцієнт серця, в/а × 10 ³	3,27 ± 0,03	2,97 ± 0,09*
Ректальна температура, °С	37,2 ± 0,3	36,3 ± 0,2*

* - $P \leq 0,05$, де P – рівень значущості t -критерію Стьюдента для різниці середніх рівнів між групами щурів.

Таблиця 2. Вплив 1-метил-2-меркаптоїмідазолу на гормональний статус щурів протягом експерименту, (M ± m)

Термін, доба	Тироксин, нмоль/л	Трийодтиронін, нмоль/л
Контроль (еутиреоїдні щури)	66,95 ± 1,55	1,61 ± 0,08
3	23,35 ± 2,33 ***	0,87 ± 0,05 ***
7	17,44 ± 0,76 ***	1,06 ± 0,03 ***
14	21,29 ± 1,26 ***	1,07 ± 0,05 ***
21	20,04 ± 1,37 ***	1,11 ± 0,08 **

** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$, де P – рівень значущості t -критерію Стьюдента для різниці середніх рівнів між контрольною та дослідними групами щурів.

Під впливом ММІ відбувалося зниження тиреоїдного статусу організму. Сироваткова концентрація тироксину протягом експерименту зменшувалася в середньому на 69,3 % ($P \leq 0,05$), від рівня у 66,95 ± 1,55 нмоль/л у еутиреоїдних тварин до 20,53 ± 1,38 нмоль/л у дослідних, трийодтироніну - у середньому на 36 % ($P \leq 0,01$), від 1,61 ± 0,08 нмоль/л у тварин контрольної групи до 1,03±0,25 нмоль/л у дослідних.

Таким чином, визначені зміни у фізіологічних та гормональних показниках вказують на

Таблиця 3. Тиреоїдний статус щурів за умов імунізації АДП-анатоксином, (M ± m)

Термін, доба	Тироксин, нмоль/л		Трийодтиронін, нмоль/л		
	Еутиреоїдні щури	Гіпотиреоїдні щури	Еутиреоїдні щури	Гіпотиреоїдні щури	
До імунізації	66,95 ± 1,55	20,53 ± 1,38 ***	1,61 ± 0,08	1,03 ± 0,25 *	
імунізація	3 (фіз. р-н)	64,07 ± 1,52	21,29 ± 1,26 ***	1,59 ± 0,09	1,06 ± 0,03 *
	3	65,83 ± 1,24	16,87 ± 0,99 ***	1,61 ± 0,08	1,07 ± 0,05 *
	7	96,39 ± 3,36	25,81 ± 1,64 ***	2,58 ± 0,08	1,41 ± 0,08 **
	14	95,57 ± 0,14	40,81 ± 2,40 **	1,78 ± 0,04	1,88 ± 0,14
	21	65,84 ± 0,85	34,56 ± 2,18 **	1,26 ± 0,02	1,98 ± 0,14 *
	28	76,49 ± 3,48	42,26 ± 1,80 **	1,73 ± 0,07	1,73 ± 0,10

* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$; де P – рівень значущості t -критерію Стьюдента для різниці середніх рівнів між еутиреоїдними та гіпотиреоїдними щурами.

Введення АДП-анатоксину супроводжувалося підвищенням сироваткового рівня T_4 відносно рівня до імунізації на 25,7 % ($P < 0,05$), 98,8 % ($P < 0,01$), 68,3 % ($P < 0,01$) та 105,8 % ($P < 0,01$) на 7, 14, 21 та 28 добу відповідно. Формування імунної реакції

адекватність тривалості й дози введення 1-метил-2-меркаптоїмідазолу для створення гіпотиреоїдного стану організму щурів з метою оцінки його ефектів на імунізацію.

Гормональна ланка регуляції імунної відповіді на тлі експериментального гіпотиреозу характеризувалася суттєвими особливостями (таблиця 3).

супроводжувалося підвищенням сироваткової концентрації T_3 відносно рівня до імунізації на 36,9 % ($P < 0,05$), 82,5 % ($P < 0,01$), 92,2 % ($P < 0,01$) та 67,9 % ($P < 0,01$) на 7, 14, 21 та 28 добу, відповідно.

Проте, у гіпотиреоїдних тварин у порівнянні з еутиреоїдними формування імунної відповіді здійснювалося при значно нижчому сироватковому рівні T_4 протягом всього експерименту та T_3 - у індуктивну фазу імунної відповіді (3 та 7 доба). У індуктивну фазу реакції відповіді сироватковий рівень T_4 був нижче за визначений у еутиреоїдних тварин на 74,4 % ($P < 0,01$), 73,2 % ($P < 0,01$) та 57,3 % ($P < 0,01$) на 3, 7 та 14 добу відповідно. У продуктивну фазу рівень T_4 був нижче у гіпотиреоїдних тварин лише на 47,5 % ($P < 0,05$) та 44,8 % ($P < 0,01$) на 21 та 28 добу, відповідно. Рівень T_3 у гіпотиреоїдних щурів був нижче, ніж у еутиреоїдних, лише на 3 та 7 добу, на 33,5 % ($P < 0,05$) та 45,3 % ($P < 0,05$), відповідно, після чого зростав до рівня у еутиреоїдних тварин.

Проведені нами дослідження свідчать, що тиреоїдний стан експериментальних тварин щільно пов'язаний з формуванням імунної відповіді на вакцинацію. Підвищення за умов щеплення сироваткової концентрації ТТГ, T_4 та T_3 визначено у молодих та старих еутиреоїдних тварин [11]. Стимуляція функціональної активності системи гіпофіз-щитоподібна залоза за умов імунізації спостерігалася і у тварин з експериментально зміненим тиреоїдним статусом. Зростання рівня тиреоїдних гормонів при імунізації на тлі гіпертиреоїдного стану організму встановлено у тварин з гіпертиреозом, викликаним впливом як екзогенних факторів (введення тироксину) [12], так і у тварин з гіпертиреозом, викликаним ендогенними факторами (модель надмірного харчування у період молочного вигодовування).

Підвищення тиреоїдного статусу супроводжувало і формування імунної відповіді на тлі помірного гіпотиреозу у тварин, що утримувалися на калорійно обмеженій дієті [13]. Наведені у статті результати свідчать про підвищення функціональної активності системи гіпофіз-щитоподібна залоза і за умов щеплення на тлі гіпотиреозу під впливом 1-метил-2-меркаптоїмідазолу.

Проведено алгебраїчний опис змін сироваткової концентрації гормонів протягом експерименту за допомогою емпіричних функцій регресії [ЕФР]. Зміни гормонального рівня після імунізації характеризувалися коливальним процесом (таблиці 2, 3). Структура ЕФР створювалася з наступних міркувань. ЕФР передбачалося представляти у виді поліномів. Рівнів варіювання факторів, що розглядали, для дози препарату (А) було два (група порівняння та група з імунізацією), для терміна після імунізації (t) – шість (до імунізації, через 3, 7, 14, 21 та 28 діб після щеплення). Тому шукані залежності були апроксимовані поліномом відносно А - першого ступеня й відносно t - п'ятого ступеня з парними взаємодіями:

$$Y = b_0 + b_1t + b_2t^2 + b_3t^3 + b_4t^4 + b_5t^5 + (b_6 + b_7t + b_8t^2 + b_9t^3 + b_{10}t^4 + b_{11}t^5)A; \quad (1)$$

де Y – відгук (логарифм концентрації одного з гормонів); b_i - емпіричні коефіцієнти.

Обробка даних методом лінійного регресійного аналізу з виключенням недостовірних коефіцієнтів регресії дозволила одержати наступні емпіричні функції регресії:

$$LgT_4 = 1,320 + 0,074(t/10)^2; \quad (2)$$

$$R^2 = 84 \% ; S_{LgT_4} = 0,009 \text{ нмоль/л};$$

$$LgT_3 = 0,02 + 0,178(t/10) - 0,005(t/10)^4; \quad (3)$$

$$R^2 = 86 \% ; S_{LgT_3} = 0,002 \text{ нмоль/л};$$

де T_4 – сироваткова концентрація тироксину, нмоль/л; T_3 – сироваткова концентрація трийодотироніну, нмоль/л; R^2 - коефіцієнт детермінації; S_Y - середньоквадратичне відхилення залишкової помилки ЕФР.

Всі коефіцієнти регресії високодостовірні ($P < 0,001$); якість отриманих ЕФР характеризується великими значеннями високодостовірних ($P < 0,001$) коефіцієнтів детермінації R^2 , що перевищують 50 %. За отриманими рівняннями (2), (3), коливання T_4 та T_3 при імунізації АДП-анатоксином на тлі гіпотиреоїдного стану організму означаються параболою 2-го та 4-го порядку, відповідно.

В результаті математичного аналізу результатів експериментів одержано емпіричні математичні моделі регуляторних змін у тиреоїдному статусі організму в динаміці процесу формування імунної відповіді в залежності від терміну після імунізації. Визначено (ЕФР (2), (3)), що за умов гіпотиреоїдного стану організму 84 % ($P \leq 0,001$) змін сироваткової концентрації тироксину та 86 % ($P \leq 0,001$) змін концентрації трийодотироніну пов'язано з формуванням імунної відповіді на АДП-анатоксин. Отримані ЕФР дозволяють визначити кількісні характеристики тиреоїдних гормонів у гіпотиреоїдних щурів у динаміці формування імунної відповіді на АДП-анатоксин у дослідженому терміні до 28 доби після імунізації.

Корекцію порушень у тиреоїдному стані організму можна розглядати як додатковий резерв стимуляції імуногенезу [14]. У попередніх дослідженнях було проведено математичний аналіз регуляторних змін тиреоїдного статусу організму за умов імунізації у еутиреоїдних [15] та гіпертиреоїдних щурів [12]. Опис ЕФР гормональних змін за умов імунного процесу може знайти застосування в експериментах по визначенню впливу засобів, корегуючих стан тиреоїдної системи організму при розробці методів медикаментозної корекції вакцинального процесу.

Висновки

1. Введення щурам лінії Вістар 1-метил-2-меркаптоїмідазолу протягом експерименту в дозі 1 мг на 100 г маси тіла супроводжується суттєвим зниженням сироваткової концентрації тироксину та трийодотироніну, зменшенням маси серця та масового коефіцієнту серця, ректальної температури тіла, що відповідає створенню гіпотиреоїдного стану організму.

2. Зміни сироваткового рівня тиреоїдних гормонів у динаміці формування імунної відповіді на

АДП-анатоксин у гіпотиреоїдних щурів описано емпіричними функціями регресії.

Література

1. Vinayagamoorthi R., Koner B.C., Kavitha S., et al. Potentiation of humoral immune response and activation of NF-k pathway in lymphocytes in experimentally induced hyperthyroid rats // *Cel. Immunol.*-2005.-V. 238.-P.56-60.
2. Klecha A.J., Genaro A.M., Gorelik G., et al Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway// *Journal of Endocrinology.*-2006.-V. 189.-P. 45-55
3. Dorshkind K., Horseman N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency // *Endocr. Rev.*-2000.-V. 21.-P. 292-312.
4. Wang H.-C., Klein J.R. Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor // *Crit. Rev. Immunol.*-2001.-V. 21.-P. 323-337.
5. Ohashi H., Itoh M. Effects of thyroid hormones on lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function // *Endocrine Regulations.*-1994.-V. 28.-P. 117-123.
6. Ballardini M, Gemignani F, Bodei L, et al. Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131 // *Mutation Research.*- 2002.-V. 514.-P. 77-85.
7. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Нікітченко Ю.В. та ін. Моделювання процесу специфічного антитілогенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином // *Інфекційні хвороби.*-2006.-№ 4.-С. 62-66.
8. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // *Ланималогия.*-1993.-№ 1.-С. 29-30.
9. Dorshkind K., Horseman N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency // *Endocrine Rev.*-2000.-V. 21.-P. 292-312.
10. Wang H.-c., Klein J.P. Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor // *Crit. Rev. Immunol.*-2001.-V. 21.-P. 323-337.
11. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Палій І.Г., Кучма І.Ю., Нікітченко Ю.В. Вікові особливості тиреоїдного статусу щурів за умов імунізації АДП-анатоксином // *Biomedical and Biosocial Anthropology.*- 2006.-№ 7.-P. 159-164.
12. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Нікітченко Ю.В., Іщенко Т.І., Цейтлін Н.А. Вплив екзогенного тироксину на стан гормональної системи щурів за умов імунізації АДП-анатоксином // *Буковинський медичний вісник.*-2008.-Т. 1, № 4.-С. 47-52.

13. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Нікітченко Ю.В., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю. Гормональний статус щурів за умов імунізації АДП-анатоксином на тлі калорійно обмеженої дієти // *Biomedical and Biosocial Anthropology.*-2007.-№ 9.-С. 148-151.

14. Патент № 59798 А, УА, МПК G01N33/48, А61К31/00. /Бабкін М.В., Стегній Б.Т., Симиренко Л.Л., Стеценко В.І., Кучерявенко Р.О.-3. № 20021210247; Заявл. 18.12.2002; Опубл.15.09.2003. Спосіб визначення резервів імуногенезу.

15. Кучма І.Ю. Гормональна ланка формування імунної відповіді на АДП-анатоксин у щурів різного віку // *Биологический вестник.*-2007.-Т. 11.-№ 2.-С. 84-87.

УДК 61:612.017:615.371

ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАН ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОТИРЕОЗУ

Кучма І.Ю., Симиренко Л.Л., Нікітченко Ю.В., Волянський А.Ю., Цейтлін Н.А.

Вивчено особливості гормональної ланки регуляції імуногенезу у щурів за умов імунізації на тлі гіпотиреоїдного стану, індукованого введенням 1-метил-2-меркаптоїмідазолу. Динаміку змін концентрації тиреоїдних гормонів сироватки крові гіпотиреоїдних щурів протягом формування поствакцинальної гуморальної імунної відповіді на АДП-анатоксин описано емпіричними функціями регресії.

Ключові слова: тиреоїдні гормони, гіпотиреоз, імунізація, гуморальна імунна відповідь, кортикостерон

УДК 61:612.017:615.371

ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС КРИС ПРИ ІМУНІЗАЦІЇ НА ФОНЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОТИРЕОЗА

Кучма І.Ю., Симиренко Л.Л., Нікітченко Ю.В., Волянський А.Ю., Цейтлін Н.А.

Изучены особенности гормонального звена регуляции иммуногенеза у крыс при иммунизации на фоне гипотиреоидного состояния, индуцированного введением 1-метил-2-меркаптоимидазола. Динамика изменений концентрации тиреоидных гормонов сыворотки крови гипотиреоидных крыс в процессе формирования поствакцинального гуморального иммунного ответа на АДП-анатоксин описана эмпирическими функциями регрессии.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны, гипотиреоз, иммунизация, гуморальный иммунный ответ, кортикостерон

UDC 61:612.017:615.371

THE HORMONAL STATUS OF RATS AT IMMUNIZATION ON THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

Kuchma I.J., Simirenko L.L., Nikitchenko J.V., Voljanskij A.J., Tsejtlin N.A.

The features of immunogenesis hormonal regulation at rats immunization on the background of experimental

hypothyroidism induced by introduction 1-metil-2-merkaptimidazol are studied. The dynamics of changes of blood whey thyroid hormones concentrations at hypothyroid rats in the course of formation of the postvaccinal humoral immune answer on ADT-anatoxin are described by empirical regression functions.

Keywords: thyroid hormones, hypothyroidism, imunization, humoral immune answer, corticosteron