

Влияние ингибитора mTOR на развитие аутоиммунного тиреоидита

Тихонова Анастасия Николаевна, Бурцева Анастасия Владимировна, Тихомирова

Мария Владимировна, Абрамова Зинаида Ивановна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Автор, с которым будет вестись переписка: Абрамова Зинаида Ивановна -Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, д. 18 (ауд. 104в), г. Казань, 420008, Россия E-mail: 89600404347, e- mail ziabramova@mail.ru

Аннотация

Актуальность. При аутоиммунном тиреоидите заместительная гормональная терапия как правило не устраняет активность аутореактивных Т-лимфоцитов, приводящих к разрушению щитовидной железы и образованию антитиреоидных антител на ранних стадиях заболевания.

Цель Поиск подхода, направленного ~~непосредственно~~ на подавление аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите.

Материал и методы исследования Экспериментальный аутоиммунный тиреоидит моделировали иммунизацией части мышей линии C57BL/6 (возраст 15 недель) тиреоглобулином дважды: на 1-е и 14-е сутки с полным и неполным адъювантом Фрейнда. Экспериментальным животным при кормлении давали 0,05% раствор NaI. Животных разделили на 3 группы: 1- интактные (n = 5), 2- после индукции заболевания (n = 7), 3- после индукции заболевания и введения сиролимуса (n = 7). Методом проточной цитометрии определяли количество CD4⁺, CD8⁺, дважды положительных и дважды негативных Т-лимфоцитов и CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Т-клеток. Степень разрушения фолликул определяли окрашиванием гематоксилин-эозином, уровень их апоптоза окрашиванием антителами к активной каспазе-3. Уровень тиреоидных антител определяли методом иммуноферментного анализа. Результаты сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа, парного t-теста (p <0,05) и представляли как среднее ± SD. Нормальность распределения определяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Бартлетта.

Результаты. В группе с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом ингибитор белка mTOR - сиролимус предотвращал инволюцию тимуса, увеличивая количество тимических Т-регуляторных клеток, и подавлял секрецию цитокинов IFN-γ, IL-17a. Ингибитор снижал уровень лимфоидной инфильтрации (D₄₅₀=0,25) по сравнению с уровнем (D₄₅₀=2,4) у мышей с ЭАТ, апоптоза клеток (D₄₅₀=0.005) по сравнению с уровнем (D₄₅₀=0.0125) в группе мышей с ЭАТ и следовательно, аутоантител к тиреопероксидазе: (D₄₅₀=3,0) по сравнению с (D₄₅₀=19) в экспериментальной группе. Таким образом,

сиролимус подавляет активацию аутоиммунного процесса через запуск Т-регуляторного иммунитета.

Вывод. Сиролимус способствует снижению уровня аутоиммунной агрессии, улучшению структуры железы, что приводит к снижению тяжести заболевания.

Ключевые слова: аутоиммунный тиреоидит, лимфоциты, апоптоз, сиरोлимус, щитовидная железа, экспериментальный аутоиммунный тиреоидит.

The effect of mTOR inhibitor on the development of autoimmune thyroiditis

Tikhonova A.N., Burtseva A.V., Tikhomirova M.V., Abramova Z.I.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract

Relevance. In autoimmune thyroiditis, hormone replacement therapy usually does not eliminate the activity of autoreactive T-lymphocytes, leading to the destruction of the thyroid gland and the formation of antithyroid antibodies in the early stages of the disease.

Objective Search for an approach aimed at suppressing the autoimmune process in autoimmune thyroiditis

Material and methods of the study. Experimental autoimmune thyroiditis was modeled by immunizing some C57BL/6 mice (aged 15 weeks) with thyroglobulin twice: on the 1st and 14th days with complete and incomplete Freund's adjuvant. Experimental animals were given 0.05% NaI solution during feeding. The animals were divided into 3 groups: 1 - intact ($n = 5$), 2 - after disease induction ($n = 7$), 3 - after disease induction and sirolimus administration ($n = 7$).

The number of CD4⁺, CD8⁺, double-positive and double-negative T-lymphocytes and CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T-cells were determined by flow cytometry. The degree of follicle destruction was determined by hematoxylin and eosin staining, the level of their apoptosis by staining with antibodies to active caspase-3. The level of thyroid antibodies was determined by enzyme immunoassay.

The results were compared using one-way analysis of variance, paired t -test ($p < 0.05$) and presented as mean \pm SD. Normality of distribution was determined using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests.

Results. In the group with experimental autoimmune thyroiditis, the mTOR protein inhibitor rapamycin (sirolimus) prevented thymus involution by increasing the number of thymic T-regulatory cells and suppressed the secretion of IFN- γ , IL-17a cytokines. The inhibitor reduced the level of lymphoid infiltration ($D_{450}=0.25$) compared to the level ($D_{450}=2.4$) in mice with EAT, cell apoptosis ($D_{450}=0.005$) compared to the level ($D_{450}=0.0125$) in the group of mice with EAT and, consequently, autoantibodies to thyroid peroxidase: ($D_{450}=3.0$) compared to ($D_{450}=19$) in the

experimental group. Thus, sirolimus suppresses the activation of the autoimmune process by triggering T-regulatory immunity.

Conclusion. The presented data show that sirolimus helps to reduce the level of autoimmune aggression, improve the structure of the gland, which leads to a decrease in the severity of the disease.

Key words: autoimmune thyroiditis, lymphocytes, apoptosis, sirolimus, thyroid gland, experimental autoimmune thyroiditis.

Актуальность

Аутоиммунный тиреоидит является наиболее распространенным заболеванием щитовидной железы (ЩЖ), типичным морфологическим признаком которого является лимфоидная инфильтрация и высокий уровень аутоантител ЩЖ, таких как антитела к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО) и антитела к тиреоглобулину (анти-ТГ) [1]. Потеря иммунологической толерантности приводит к запуску В- и Т-клеточного иммунитета, направленного против ЩЖ и ее дальнейшему разрушению и гипотиреозу [2]. Статистика показала, что среднемировая распространенность АИТ среди взрослого населения составляет 7,5%, а ежегодная заболеваемость - 30–150 случаев на 100000 человек [3].

Республика Татарстан, как и многие регионы России, относится к территориям с дефицитом йода. Недостаток йода в почве и воде является причиной развития йододефицитных заболеваний у населения. Еще в работе Хакимова А. М. (1987 г) при характеристике распространенности эндемических болезней в Татарии на примере трех природных зон, отличающихся почвенно-климатическими и геохимическими условиями: в Предкамье, в Предволжье и в Закамье при изучении специфических реакций организма (37 тыс человек) в указанных районах показал распространенность эндемического увеличения щитовидной железы. Причем автор установил, что появление эндогенной йодной недостаточности и распространенности в данных районах связано с аномальным геохимическим фоном среды, сочетающимся с нерациональным питанием [4].

В 2022 году вышла статья Фроловой с соавторами, в которой было представлено исследование, выполненное по материалам официальной статистики Республики Татарстан за 2014-2019 годы и отмечена тенденция роста первичной заболеваемости населения РТ болезнями щитовидной железы с 177,3 до 273,3 на 100 тысяч населения [5].

По словам главного специалиста - эксперта отдела надзора по гигиене питания Управления Роспотребнадзора по РТ Кадрии Шамсутдиновой: «В 2022 году заболеваемость йододефицитными состояниями (синдром врожденной йодной недостаточности, эндемический зоб, связанный с йодной недостаточностью, субклинический гипотиреоз вследствие йодной недостаточности и другие формы гипотиреоза) составила 85,2 на 100

тысяч населения»¹. В 2023 г заболеваемость вновь выросла и составила 86,4 на 100 тысяч населения). В целом, по данным заместителя начальника отдела надзора по гигиене питания Управления Роспотребнадзора по РТ Татьяна Рыбаченок: «Благодаря целенаправленной работе министерств и ведомств республики заболеваемость йододефицитными состояниями среди населения республики за 10 лет снизилась. Согласно данным официальной статистики, в 2024 году заболеваемость йододефицитными состояниями в РТ составляет 67 на 100 тысяч человек по сравнению с 2023 годом»². Несмотря на положительную тенденцию проблема остается актуальной.

Заместительная терапия синтетическим тироксином является общепринятой терапией для пациентов с гипотиреозом [6]. Это связано с тем, что левотироксин является синтетическим аналогом тироксина (Т4), гормона, который вырабатывается щитовидной железой, и его прием восполняет недостаток гормонов щитовидной железы при гипотиреозе [7]. Однако, несмотря на облегчение симптомов гипотиреоза, гормонозаместительная терапия не устраняет корня проблемы, а именно повышенную активность аутореактивных Т-лимфоцитов, приводящих к хроническому воспалению и разрушению ЩЖ, и не предохраняет от развития ассоциированных аутоиммунных заболеваний [8] и рака ЩЖ [9]. При нормальной функции ЩЖ пациентам, с диагностированным АИТ, лечение не назначается, поскольку нет специфического терапевтического подхода, направленного непосредственно на подавление аутоиммунного процесса при АИТ. Прогрессирование заболевания в конечном итоге приводит к гипотиреозу и требует пожизненного приема левотироксина [10].

Сиролимус —ингибитор киназы mTOR с IC₅₀ 0,1 нМ в клетках HEK293. Он связывается с FKBP12 и действует как аллостерический ингибитор mTORC1, который играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний [11], поскольку участвует в ремоделировании тканей и повреждении органов иммунными клетками.

¹.Киселёва Э. Йода в воде и почве в РТ недостаточно»: Роспотребнадзор о болезнях из-за йододефицита [Общество 19 июля 2023 11:00] Режим доступа: <https://www.tatar-inform.ru/news/ioda-v-vode-i-pocve-v-rt-nedostatocno-rospotrebnadzor-o-boleznyax-iz-za-iododeficit-5911804>

²Баданов Р. Дефицит йода – причина выкидышей и задержек в развитии»: почему важно есть фрукты и рыбу [Общество 29 апреля 2025 19:00] Режим доступа: <https://www.tatar-inform.ru/news/deficit-ioda-privina-vykidysei-i-zaderzek-v-razvitii-pocemu-vazno-est-frukty-i-rybu-5982456>

С другой стороны, киназа mTOR является одной из точек молекулярного взаимодействия путей аутофагии и апоптоза, которые регулируют выживание и гибель клеток в стрессовых условиях. Нарушения процесса цитопротекторной аутофагии (процесса, который позволяет клеткам избегать апоптотических сигналов), в норме способствующие выживаемости клеток, играют важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний и могут являться причиной клеточной гибели как в таргетных органах, так и клеток иммунной системы [12]. Таким образом, нарушения процессов инициации и реализации летальной программы клеток часто становятся основополагающими в определении характера и тяжести течения заболевания. Например, показана роль апоптоза в патогенезе заболеваний ЩЖ. Гормоны ЩЖ также могут влиять на процессы программированной гибели клеток и индуцировать аутоиммунные процессы [12], поэтому поиск подхода, направленного на непосредственное подавление аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите, является важной задачей.

Цель Поиск подхода, направленного на подавления аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили образцы органов и кровь от мышей с экспериментально индуцированным аутоиммунным тиреоидитом (ЭАТ). Все эксперименты, в которых были использованы мыши, проводились в соответствии со стандартными протоколами, одобренными Комитетом по содержанию и обращению с животными в лабораторных целях (Выписка из протокола № 49 ЛЭК Казанского (Приволжского) федерального университета от 27.06.2024). 19 самок мышей линии C57BL/6 в возрасте 7 недель содержались в специально чистых условиях в течение 8 недель и случайным образом были разделены на 3 группы: 1) контрольная группа ($n = 5$); 2) группа с индукцией ЭАТ без лечения ($n = 7$); 3) группа с индукцией ЭАТ в присутствии сиролимуса (рапамицина, англ. Rapamycin, Servicebio, Китай) ($n = 7$). Для индукции классического ЭАТ мышей иммунизировали тиреоглобулином (100 мкг/мышь), а для повышения иммуногенности белка при кормлении животным давали 0,05% раствор NaI.

После индукции ЭАТ мышам в группе 3 внутрибрюшинно вводили сиролимус [13] растворенный в PBS (1 мг/кг веса) на 1, 3 и 5 дни недели в течение 5 недель. Группа 2 в качестве контроля получала такое же количество PBS.

После окончания эксперимента мыши были подвергнуты эвтаназии. Щитовидная железа, тимус, селезенка и периферическая кровь были отобраны для дальнейшего исследования. Кроме того, измерялась масса тела мыши и масса органов (щитовидная

железа, селезенка, тимус), а коэффициент органа (вес органа/вес животного) сравнивался между контролем и опытом.

Для гистологического исследования органы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем обезживали в спиртах возрастающей концентрации с последующим получением парафиновых срезов, толщиной 5 мкм.

Для анализа степени лимфоидной инфильтрации и разрушения фолликулярных клеток гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике в 4 этапа:

1) депарафинизация: срезы последовательно выдерживали в растворах ксилола, 95% и 70% этанола (по 5 мин); 2) для ядерной окраски использовали гематоксилин Майера, который дает элективное окрашивание; 3) цитоплазму окрашивали раствором эозина; 4) дегидратация: срезы последовательно выдерживали по 1 - 2 минуте в растворах 70% и 95% этанола и ксилоле.

По результатам окрашивания оценивали степень моноклеарной клеточной инфильтрации и разрушения фолликулов (Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit Abscam, Великобритания), иллюстрирующие степень патологии воспаления щитовидной железы:

1) Индекс патологии 0 - инфильтрация отсутствует, фолликулы щитовидной железы не повреждены.

2) Индекс патологии 0,5 - поражение от >0% до 10% с определенными периваскулярными очагами инфильтрации.

3) Индекс патологии 1,0 - инфильтрация от >10% до 20% с разрушением фолликулов.

4) Индекс патологии 2,0 - разрушение от >20% до 40% фолликулов.

5) Индекс патологии 3,0 - поражение от >40% до 80%

6) Индекс патологии 4,0 - поражение >80%

Для оценки уровня апоптоза фолликулярных клеток ЩЖ срезы окрашивали антителами к активной каспазе-3 (Cleaved-Caspase 3 (Asp175), p17 Antibody - ELISA kit по стандартной методике (Affinity, Китай)).

Уровень антител к тиреоидной пероксидазе в плазме мышей определяли методом иммуноферментного анализа (Mouse TPO-Ab (anti-Thyroid Peroxidase) ELISA Kit) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Elabscience, КНР). Для получения плазмы в пробирку с ЭДТА было забрано 0 5 мл крови методом пункции сердца. Плазму получали центрифугированием (2000 g, 5 минут). В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл стандарта и разведенного образца, через 30 минут в каждую лунку добавляли 100 мкл биотинилированных антител (инкубация 1 час), затем последовательно

инкубировали в 100 мкл HPR - конъюгированных антител (30 минут) и в HPR - субстрате (15 минут) с последующим добавлением стоп-реагента. Оптическую плотность (D) определяли при длине волны 450 нм.

Тимус каждой мыши помещали на стерильное клеточное сито с порами 70 мкм. После медленного смешивания с 20 мл культуральной среды RPMI 1640 (содержащей 10% инактивированной сыворотки FBS) селезенку измельчали механически. Клеточную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 10 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов и получения суспензии тимоцитов.

Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания клеток, добавляли 0,5 мкл FITC - меченых антител к CD4 мыши (Biolegend, США) и 1 мкл PE-меченых антител к CD8 мыши в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Biolegend, США) и инкубировали в течении 10 мин. Образцы изучали методом проточной цитометрии на первом (FL1) и втором (FL2) детекторах проточного цитометра BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson). При учете результатов на каждый вариант опыта подсчитывали не менее 10000 событий. Мёртвые клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. В результате определяли количество CD4+, CD8+ и дважды положительных (DP) и дважды негативных Т-лимфоцитов (DN).

Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания, добавляли 5 мкл PE-меченых антител к CD4 и FITC-меченых антител к CD25 (Elabscience, Китай), инкубировали в течении 30 мин. Окрашивание FoxP3 проводили с помощью набора FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend, США) и APC-меченых антител к FoxP3 (Elabscience, Китай) по протоколу производителя. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 1× буфера FoxP3 Perm, добавляли 5 мкл конъюгированных с флуорохромом антител против FoxP3 и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Образцы промывали и определяли процентное содержание CD4+ CD25+ FoxP3+ Т-клеток на первом (FL1) и втором (FL2) детекторах проточного цитометра.

Для оценки индукции апоптоза в тимоцитах, определяли уровень апоптоза Т лимфоцитов в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Lumiprobe, США). В работе использовали аннексин V - AF 488, конъюгированный с FITC (AnnV-FITC) и пропидиум йодид (PI). Определяли AnnV-FITC⁺PI⁻ – ранний апоптоз, AnnV-FITC⁺PI⁺ – поздний апоптоз и некроз. Клетки в концентрации 1×10^6 клеток / мл ресуспендировали в 1 × Аннексин V связывающем буфере, инкубировали 10 минут с аннексином V-AF 488, 5 минут – с пропидий йодидом (PI) при комнатной температуре в темноте.

Селезенку каждой мыши помещали на стерильное клеточное сито с порами 70 мкм и, смешивая с культуральной средой RPMI 1640, механически измельчали. Клеточную суспензию центрифугировали (400 g 10 минут), клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса эритроцитов. Количество клеток селезенки подсчитывали после окрашивания трипановым синим и доводили до концентрации 2×10^6 клеток/тест. Образцы культивировали 5 ч в 24-луночных планшетах, каждая лунка содержала 1 мл среды для культивирования клеток RPMI 1640 с добавлением специфических индукторов (eBioscience Company, США). Процедуру анализа внутриклеточных про- и противовоспалительных цитокинов клеток, включающую в себя этапы фиксации, пермеабилзации и окрашивания специфическими моноклональными антителами к IFN- γ , IL-4 и IL-17a, проводили согласно протоколу фирмы производителя (eBioscience Company, США). Образцы анализировали в первом (FL1), втором (FL2) и четвертом (FL4) детекторах цитометра.

Достоверность полученных результатов определяли с помощью анализа «ANOVA». Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, осуществляли с помощью пакета программ «Fiji». Для анализа данных цитометрии использовали программу «FlowJo». Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Результаты выражены как среднее значение величины \pm стандартное отклонение. Данные обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и последующего попарного сравнения с поправкой на множественность Бонферрони (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0005$, **** – $p < 0.0001$). Нормальность распределения количественной переменной и гомогенность дисперсий у нескольких распределений определяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Бартлетта соответственно.

Результаты и обсуждение

Тяжесть заболевания мышей с моделью ЭАТ и мышей, получавших сиролimus, оценивали по изменению титра антител к тиреопероксидазе (анти-ТПО), степени лимфоидной инфильтрации ЩЖ и уровню апоптоза фолликулярных клеток ЩЖ.

Окрашивание гематоксилином и эозином (рис. 1, А) выявило наличие повышенной лимфоидной инфильтрации ЩЖ и морфологические изменения фолликулов в группе мышей с ЭАТ. Показатель инфильтрации лимфоцитов ($D_{450}=2,4$) у мышей с ЭАТ был достоверно выше ($p < 0,0001$), чем у нормальных мышей ($D_{450}=0,13$) и мышей, получавших сиролimus ($D_{450}=0,25$) ($p < 0,0001$) (рис. 1, Б). Как следует из рисунка 1, В титр анти-ТПО ($D_{450}=19$) в группе мышей с ЭАТ также был достоверно повышен ($p < 0,001$) по сравнению с контролем ($D_{450}=2,5$), а добавление сиролимуса снижало ($p < 0,001$) их в среднем до уровня контроля ($D_{450}=3,0$) в экспериментальной группе.

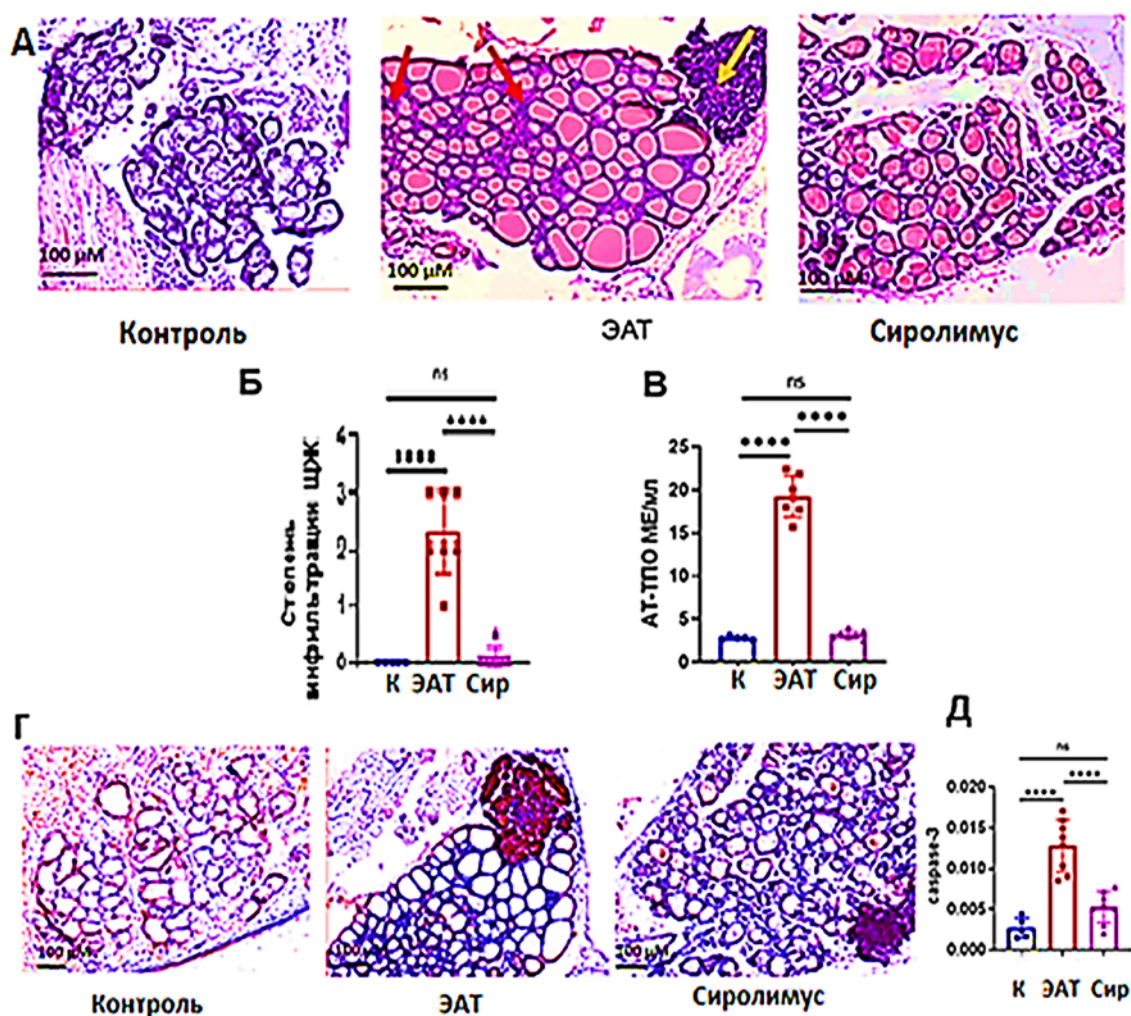


Рис. 1. Оценка тяжести аутоиммунного тиреоидита у мышей. А) Окрашивание гематоксилином и эозином ткани щитовидной железы. Красной стрелкой показана лимфоцитарная инфильтрация, желтой стрелкой – разрушенные фолликулы щитовидной железы. Б) Определение уровня лимфоцитарной инфильтрации по средней оптической плотности (D_{450})/ В) Уровень анти-ТПО в плазме. Г) Иммуногистохимический анализ локализации активной каспазы-3 в ткани щитовидной железы. Д) Средняя оптическая плотность каспазы-3 в фолликулярных клетках щитовидной железы. К – контроль, ЭАТ – экспериментальный аутоиммунный тиреоидит, Сир – сиролимус, **** $p < 0,0001$

Fig. 1. Evaluation of the severity of autoimmune thyroiditis in mice. А) Hematoxylin and eosin staining of thyroid tissue. The red arrow shows lymphocytic infiltration, the yellow arrow – destroyed thyroid follicles. В) Determination of the level of lymphocytic infiltration. С) The level of anti-TPO in plasma. Д) Immunohistochemical analysis of the localization of active caspase-3 in thyroid tissue. Е) Average optical density of caspase-3 in follicular cells of the thyroid gland. C – control, EAT – experimental autoimmune thyroiditis, Sir – sirolimus, **** $p < 0.0001$

При оценке апоптоза выявили повышенный уровень активной каспазы-3 в группе мышей с ЭАТ ($D_{450}=0.0125$) по сравнению с контролем ($D_{450}=0.0025$). Применение сиролимуса приводило к подавлению активности каспазы-3 ($D_{450}=0.005$) ($p < 0,0001$) (рис. 1,

Г и Д). Таким образом, установлено, что сиролимус снимает воспаление при АИТ и предотвращает апоптоз фолликулярных клеток ЩЖ.

Т-клетки проходят несколько этапов в своем развитии. На самой ранней стадии предшественники костномозгового происхождения в тимусе не экспрессируют ко-рецепторы CD4 и CD8 и называются как CD4-CD8- двойные негативные (DN) тимоциты (3–5% от общего числа тимоцитов). В результате созревания Т-клетки переходят из категории DN в категорию двойных положительных (DP), начиная экспрессировать ко-рецепторы CD4+CD8+ (75–85% от всей популяции тимоцитов). DP-клетки изначально экспрессируют низкие уровни Т-клеточных рецепторов, большинство из которых не могут распознавать аутопептиды МНС или молекулярные комплексы МНС-пептида, и они в положительном отборе погибают. Остальные клетки DP дифференцируются в две популяции: CD4⁺ и CD8⁺ одиночные положительные (SP) тимоциты, которые составляют, примерно, 15% всех тимоцитов [14].

Влияние сиролимуса на тимическую пролиферацию (рис.1А) определяли по соотношению DP-клеток, DN-клеток и SP-клеток (рис. 2, Б). Анализ дифференцировки Т-лимфоцитов тимуса выявил истощение DP-клеток в группе мышей с ЭАТ по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об инволюции тимуса [15, 13]. Использование сиролимуса приводило к увеличению количества DP-клеток в этой группе ($p < 0,01$, рис. 2Б). При этом количество CD4⁺SP-клеток в группе с ЭАТ как по сравнению с контрольной группой, так и с группой мышей, получавших сиролимус, было повышено (рис. 2, В). Следовательно, при индукции АИТ сиролимус предотвращает истощение DP-клеток.

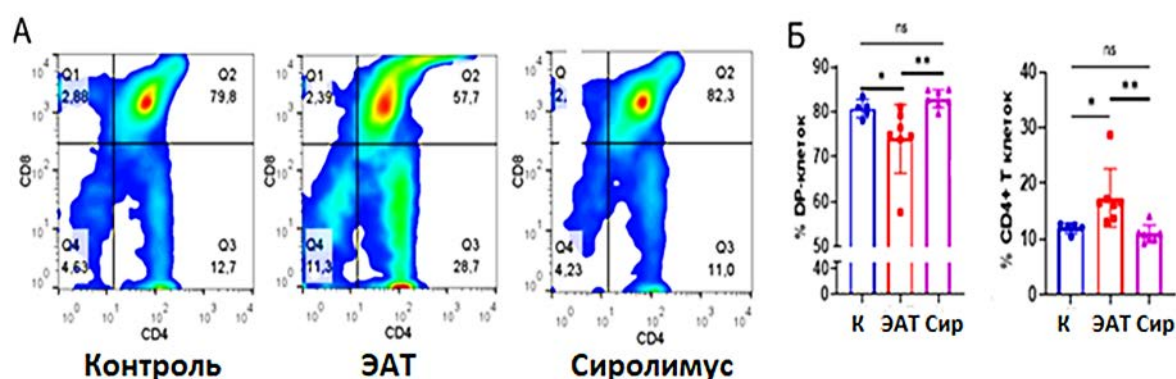


Рис. 2. Истощение популяции DP-клеток в тимусе мышей с ЭАТ. А) Репрезентативные графики окрашивания анти-CD4/CD8 тимоцитов контрольных мышей, с ЭАТ и группы, получающей сиролимус. Б) Оценка стадий тимопоэтического процесса проточной цитометрией у мышей с ЭАТ (красный), группы, получавшей сиролимус (фиолетовый) и контрольной группы (синий). К – контроль, ЭАТ – экспериментальный аутоиммунный тиреоидит, Сир – сиролимус; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Fig. 2. Depletion of DP cells in the thymus of mice with EAT. A) Representative plots of anti-CD4/CD8 staining of thymocytes from control, EAT, and sirolimus-treated mice. B) Assessment of the stages of the thymopoietic process by flow cytometry in mice with EAT (red), sirolimus-treated (purple), and control (blue). C – control, EAT – experimental autoimmune thyroiditis, Sir – sirolimus; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Инволюция или атрофия тимуса, приводит к менее эффективному развитию Т-клеток и созданию ограниченного репертуара периферических Т-клеток. В инволютивном тимусе наблюдается неэффективная центральная толерантность, которая включает в себя нарушение негативного отбора, что приводит к увеличению продукции аутореактивных Т-клеток, и несбалансированную генерацию репертуара Treg, которые не в состоянии в достаточной степени подавить аутоиммунные реакции, опосредованные Т-клетками [16].

Проведенная оценка апоптоза показала понижение количества клеток на стадии апоптоза у мышей с ЭАТ по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$, рис. 3, Б), что подтверждает нарушение негативного отбора и неспособность удалять аутоиммунные Т-клетки на уровне тимусной селекции и устойчивость Т-клеток внутри железы к апоптозу.

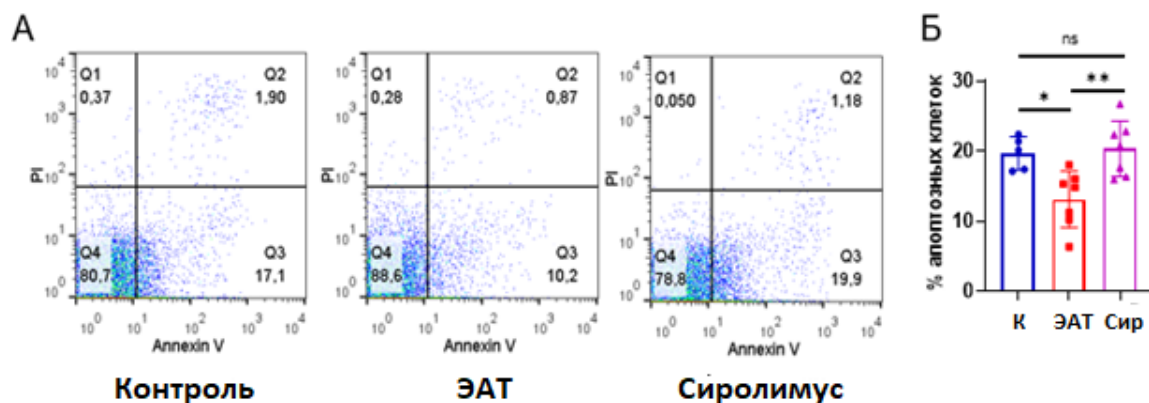


Рис. 3. Анализ уровня апоптоза в тимоцитах с помощью FCM-анализа двойного окрашивания Аннексином V/PI. А) Репрезентативные графики проточной цитометрии. Б) Количество Т-лимфоцитов с признаками апоптоза (Annexin V+) от общей популяции клеток (в %). К – контроль, ЭАТ – экспериментальный аутоиммунный тиреоидит, Сир – сиrolимус; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig. 3. Analysis of the level of apoptosis in thymocytes using FCM analysis of Annexin V/PI double staining. A) Representative flow cytometry graphs. B) The number of T lymphocytes with signs of apoptosis (Annexin V+) from the total cell population (in %). C – control, EAT – experimental autoimmune thyroiditis, Sir – sirolimus; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Таким образом, мы показали, что при ЭАТ не наблюдается истощения атрофированного тимуса, что происходит, главным образом, за счет увеличения выработки аутореактивных Т-клеток в тимусе.

Вторым направлением индукции иммунологической толерантности является генерация тимусных регуляторных Т лимфоцитов (Treg). Treg индуцируют механизмы только

периферической толерантности. CD25+CD4+Treg- клетки, активно супрессируют активацию потенциально патогенных аутореактивных Т-клеток, присутствующих в норме в иммунной системе. Молекулярным маркером Treg-клеток является Foxp3. Foxp3 репрессор транскрипции, связываясь с ДНК ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов. Установлено, что для CD25+CD4+ Treg-клеток характерна высокая экспрессия Foxp3. Предполагается, что Treg-клетки компенсируют недостатки негативного отбора, которые позволяют некоторым аутореактивным Т-клеткам проникать на периферию [14]. Атрофированный тимус теряет способность устанавливать центральную толерантность, что приводит к выходу повышенного количества аутореактивных Т-клеток на периферию и участию в процессе воспаления [15]. В связи с этим в тимусе было определено количество CD4+ CD8+ CD25+ Foxp3+ Т - клеток. Поскольку индукция Foxp3 происходит на стадии DP-клеток, до коммитирования линий CD4+ или CD8+ [17], анализировали именно эту популяцию. Для идентификации субпопуляции Treg тимоциты мышей окрашивали антителами к CD25, CD8 и CD4 перед внутриклеточным окрашиванием Foxp3 (рис. 4).

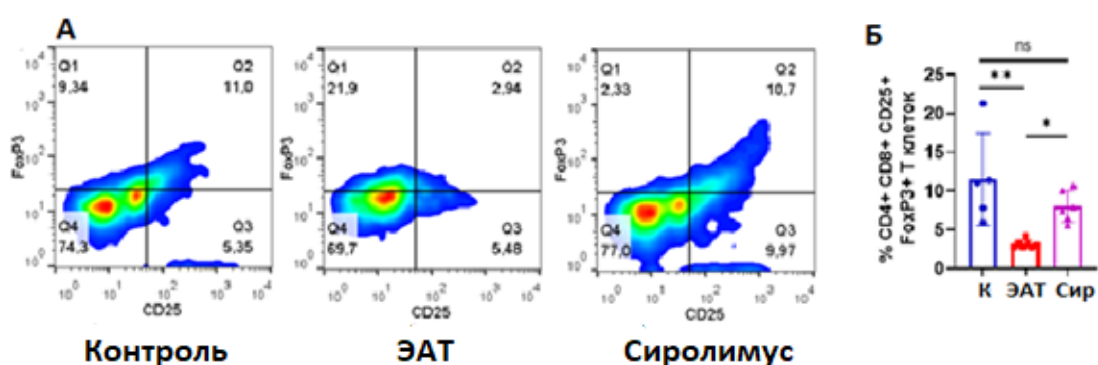


Рис. 4. Оценка экспрессии CD25 и FoxP3 на тимоцитах. А) Репрезентативные графики проточной цитометрии. Б) Количество CD25⁺ FoxP3⁺ клеток мышей контрольной группы, ЭАТ и группы, получавшей сиrolимус. К – контроль, ЭАТ – экспериментальный аутоиммунный тиреоидит, Сир – сиrolимус; *p < 0,05, **p < 0,01

Fig. 4. Evaluation of CD25 and FoxP3 expression on thymocytes. A) Representative flow cytometry graphs. B) Number of CD25⁺ FoxP3⁺ cells in mice of the control group, EAT and the group treated with sirolimus. C – control, EAT – experimental autoimmune thyroiditis, Sir – sirolimus; *p < 0.05, **p < 0.01

И обнаружили, что экспрессия CD25 и Foxp3 была значительно снижена (p < 0,01) в тимусе мышей с ЭАТ по сравнению с контрольными мышами. Добавление сиrolимуса приводило к увеличению популяции Treg (p < 0,05). Эти данные демонстрируют, что рапамицин индуцирует увеличение частоты Treg в тимусе мышей с ЭАТ.

Цитокины, секретируемые клетками иммунной системы, регулируют продолжительность и интенсивность иммунного ответа. Экспериментально показано, что избыточная или недостаточная выработка цитокинов может вносить значительный вклад в

патофизиологию ряда заболеваний [18]. В частности, концепция псориаза как строго Th1 / Th2 – зависимого заболевания получила развитие: показано, что CD4+ Th17 Т- клетки (которые продуцируют IL-17) играют важную роль в патогенезе псориаза [19].

CD4+ клетки в функциональном отношении делятся на два вида хелперных лимфоцитов: Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- β) и Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13). В основном, для Th1- и Th2-клеток характерны ключевые цитокины (IFN- γ и IL-4, соответственно), так как синтез IL-2, IL-6 и IL-10 не строго ограничен одной субпопуляцией. Наивные CD4 Т-клетки (Th0) могут быть дифференцированы в Th17 клетки, секретирующие профиль мощных провоспалительных цитокинов, включая IL-17, IL-21, IL-22 и мощные TNF- α и IL-6 при определенной стимуляции [20,21]. Поэтому была проведена оценка уровня секреции цитокинов, вырабатываемых Th1, Th2 и Th17.

Учитывая, что покоящиеся иммунные клетки вырабатывают минимальное количество цитокинов для удовлетворения своих основных потребностей, а профили цитокинов из инактивированной крови могут неточно отражать состояние иммунной функции, спленоциты предварительно подвергались стимуляции. Клетки стимулировали с помощью РМА и иономицина в присутствии брефелдина перед окрашиванием внутриклеточных цитокинов на экспрессию IFN- γ , IL-4 и IL-17A. Комбинация РМА и иономицина активирует факторы транскрипции NF- κ B и NFAT, что приводит к выработке цитокинов, а брефелдин А блокирует везикулярный транспорт, что позволяет измерять количество цитокинов внутри клетки [22].

В результате выявили повышенную секрецию IFN- γ ($p < 0,05$) и IL-17A ($p < 0,01$) в группе мышей с ЭАТ и пониженный уровень секреции IL-4 ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. Применение рапамицина приводило к подавлению секреции IFN- γ ($p < 0,01$) и IL-17A ($p < 0,01$) при ЭАТ. Секреция IL-4 не изменилась (рис. 5).

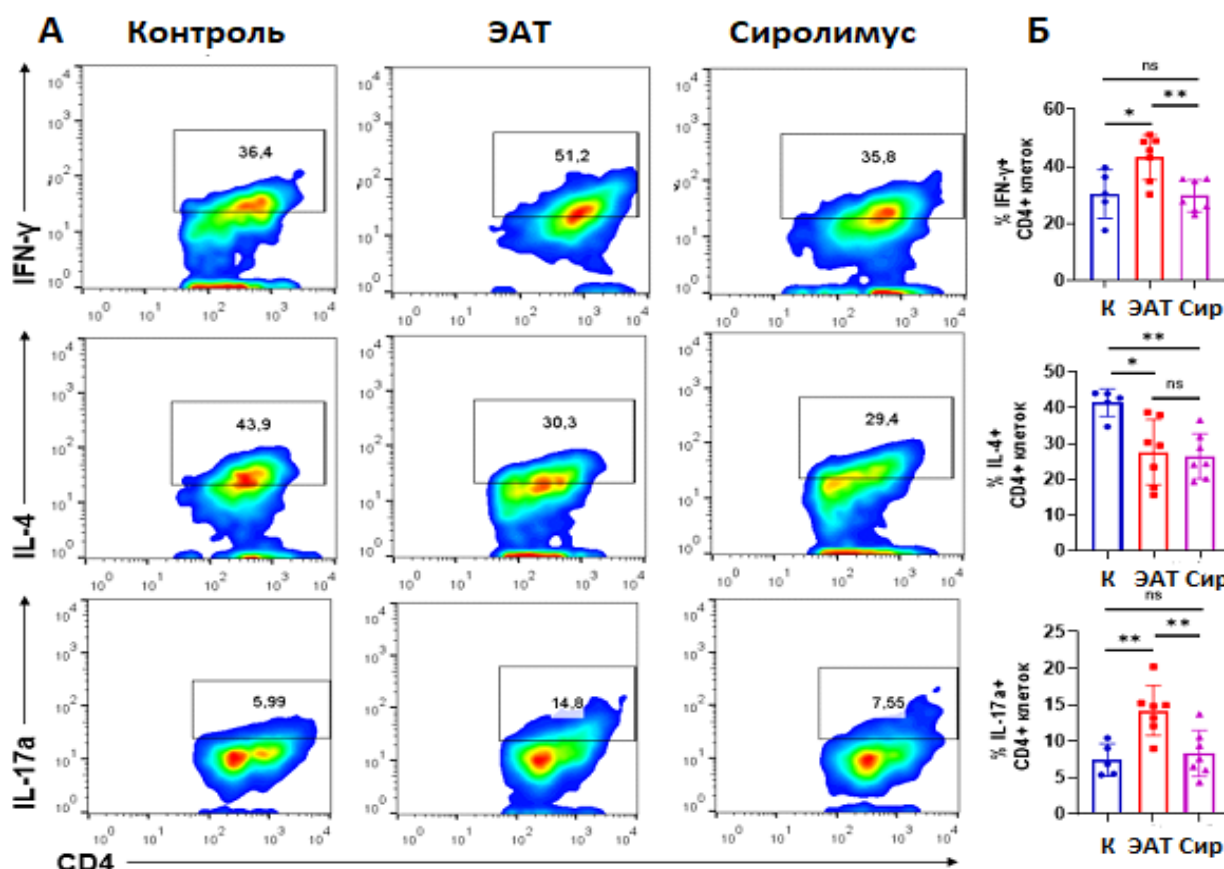


Рис. 5. Окрашивание CD3+CD4+ Т-клеток методом проточной цитометрии на внутриклеточные цитокины. А) Репрезентативное окрашивание FACS. Б) Количество клеток (в %), синтезирующих IFN-γ, IL-4 или IL-17A. К – контроль, ЭАТ – экспериментальный аутоиммунный тиреоидит, Сир– сиролимус; *p < 0,05, **p < 0,01

Fig. 5. Flow cytometric staining of CD3+CD4+ T cells for intracellular cytokines. A) Representative FACS staining. B) Number of cells (in %) synthesizing IFN-γ, IL-4 or IL-17A. C – control, EAT – experimental autoimmune thyroiditis Sir – sirolimus; *p < 0.05, **p < 0.011

Закключение

Исследование было направлено на изучение эффекта действия сиролимуса на модель ЭАТ. Нарушение механизмов центральной и периферической толерантности играет важную роль в развитие АИТ, поэтому оценили влияние сиролимуса на запуск периферической толерантности, т.е. запуск Т-регуляторного иммунитета. При оценке влияние сиролтмуса на степень тяжести тиреоидита на мышинной модели ЭАТ выявили, что ингибитор снижал степень лимфоидной инфильтрации щитовидной железы, уровень антител к тиреоидной пероксидазе и подавлял апоптоз фолликулярных клеток. Дифференцировка тимоцитов сопровождалась понижением количества DP-клеток и CD4+ CD8+ CD25+ FoxP3+ клеток при ЭАТ, что свидетельствует об инволюции тимуса. Применение сиролимуса приводило к увеличению DP-клеток и CD4+ CD8+ CD25+ FoxP3+ клеток и снижению секрецию основных провоспалительных цитокинов - IFN-γ и IL-17A.

Выводы:

1. Сиролимус снижает уровень воспаления (уровень лимфоцитарной инфильтрации, аутоантител к тиреоидной пероксидазе, провоспалительных цитокинов IFN- γ , IL-17a) и апоптоза щитовидной железы при экспериментальном аутоиммунном тиреоидите.
2. Сиролимус предотвращает инволюцию тимуса (увеличивается количество DP-клеток) и увеличивается количество тимических Т-регуляторных клеток при экспериментальном аутоиммунном тиреоидите.
3. Сиролимус подавляет активацию аутоиммунного ответа через запуск Т-регуляторного иммунитета, за счет увеличения количества CD4+CD25+FoxP3+ Treg-клеток при АИТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Boutzios G., Koukouliti E., Goules A. V., et al. Hashimoto thyroiditis, anti-parietal cell antibodies: associations with autoimmune diseases and malignancies. *Frontiers in endocrinology*. 2022;(13):860880. doi: 10.3389/fendo.2022.860880
2. Ralli M., Angeletti D., Fiore M., et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(10):102649. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102649
3. Kazakova MP, Tskaeva AA, Starostina EA, Troshina EA. Autoimmune thyroiditis - what's new? *Clinical and experimental thyroidology*. 2023;19(4):4-12. <https://doi.org/10.14341/ket12781>
4. Хакимова А.М. Эндемические болезни в Татарии как гигиеническая проблема // *Казанский медицинский журнал*. 1987. Т. 68, №. 5. С. 325-328. doi: <https://doi.org/10.17816/kazmj96484>
5. Фролова О. А., Тафеева Е. А., Фролов Д. Н., Янгирова Э. Х. Ретроспективный анализ заболеваемости болезнями эндокринной системы населения Республики Татарстан. // *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2022. Т. 30, №. 5. С. 795-800. doi: <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2022-30-5-795-800>.
6. Фадеев В.В. Принципы заместительной терапии // *Consilium Medicum*. 2014.-Т. 16, №4. С.48-50
7. Manuylova Yu.A., Morgunova T.B., Fadeyev V.V. Causes of treatment failure in primary hypothyroidism. *Clinical and experimental thyroidology*. 2019;15(1):12-18. (In Russ.) doi.org/10.14341/ket10163
8. Antonelli A., Benvenga S. Editorial: The Association of other autoimmune diseases in patients with thyroid autoimmunity. *Frontiers Endocrinol*. 2018;9:540. doi: 10.3389/fendo.2018.00540
9. Cappellacci F., Canu G. L., Lai M. L., et al. Association between hashimoto thyroiditis and differentiated thyroid cancer: A single-center experience. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:959595. doi: 10.3389/fonc.2022.959595
10. Gottwald-Hostalek, U., Razvi, S. Getting the levothyroxine (LT4) dose right for adults with hypothyroidism: opportunities and challenges in the use of modern LT4 preparations. *Current Medical Research and Opinion*. 2022;38(11):1865-1870. doi: 10.1080/03007995.2022.2071059

11. Montero, N., Quero, M., Melilli, E., et al. Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors Combined With Calcineurin Inhibitors as Initial Immunosuppression in Renal Transplantation: A Meta-analysis. *Transplantation*. 2019;103(10):2031-2056. doi: 10.1097/TP.0000000000002769
12. Suto T., Karonitsch T. The immunobiology of mTOR in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2020. V.110(1):102373. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102373
13. Wen, H. Y., Wang, J., Zhang, S. X., et al. Low-Dose Sirolimus Immunoregulation Therapy in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: A 24-Week Follow-Up of the Randomized, Open-Label, Parallel-Controlled Trial. *Journal of immunology research*. 2019;2019(1):7684352. doi: 10.1155/2019/7684352
14. Delfino D.V., Pozzesi N., Pierangeli S., et al. Manipulating thymic apoptosis for future therapy of autoimmune diseases. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(29):3108-3119. doi:10.2174/138161211798157621
15. Lynch H.E., Goldberg G.L., Chidgey A., et al. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in immunology*. 2009;30(7):366-373. doi:10.1016/j.it.2009.04.003
16. Thomas R., Wang W., Su D.M. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immunity & Ageing*. 2020;(17):2. doi:10.1186/s12979-020-0173-8
17. Burger M.L., Leung K.K., Bennett M.J., Winoto A. T cell-specific inhibition of multiple apoptotic pathways blocks negative selection and causes autoimmunity *life*. 2014;(3):e03468. doi:10.7554/eLife.03468
18. Nunes-Cabaço H., Caramalho I., Sepúlveda N., Sousa A.E. Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage *European journal of immunology*. 2011;41(12):3604-3614. doi:10.1002/eji.201141614
19. Siebert S., Tsoukas A., Robertson J., McInnes I. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases *Pharmacological reviews*. 2015;67(2):280-309. doi:10.1124/pr.114.009639
20. Raphael I., Nalawade S., Eagar T.N., Forsthuber T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases *Cytokine*. 2015;74(1):5-17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
21. Talaat R.M., Mohamed S.F., Bassyouni I.H., Raouf A.A. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity *Cytokine*. 2015;72(2):146-53. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.027
22. Ganesh B.B., Bhattacharya P., Gopisetty A., Prabhakar B.S. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011;31(10): 721-731. doi:10.1089/jir.2011.0049