

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ642165> EDN: JGADUP

# Влияние ингибитора mTOR на развитие аутоиммунного тиреоидита

А.Н. Тихонова, А.В. Бурцева, М.В. Тихомирова, З.И. Абрамова

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

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** 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 исследования.** Поиск подхода, направленного на подавление аутоиммунного процесса при аутоиммунном тиреоидите.

**Методы.** Экспериментальный аутоиммунный тиреоидит (ЭАТ) моделировали путём иммунизации мышей линии C57BL/6 (возраст 15 нед) тиреоглобулином дважды: на 1-е и 14-е сутки с использованием полного и неполного адьюванта Фрейнда. Экспериментальным животным при кормлении давали 0,05% раствор NaI. Мышей разделили на три группы: 1-я — интактные (n=5), 2-я — после индукции заболевания (n=7), 3-я — после индукции заболевания и введения сиролимуса (n=7). Методом проточной цитометрии определяли количество CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, дважды положительных и дважды негативных Т-лимфоцитов, а также CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток. Степень разрушения фолликул устанавливали по окрашиванию гематоксилином и эозином, уровень апоптоза — по окрашиванию антителами к активной каспазе-3. Уровень тиреоидных антител определяли методом иммуноферментного анализа. Статистический анализ выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и парного t-теста ( $p < 0,05$ ); данные представляли как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Нормальность распределения проверяли тестами Шапиро–Уилка и Бартлетта.

**Результаты.** В группе с ЭАТ ингибитор белка mTOR — сиролимус — предотвращал инволюцию тимуса, увеличивал количество тимических Т-регуляторных клеток и подавлял секрецию цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-17A. Применение ингибитора снижало уровень лимфоидной инфильтрации ( $D_{450}=0,25$ ) по сравнению с мышами ЭАТ ( $D_{450}=2,4$ ), а также уровень клеточного апоптоза ( $D_{450}=0,005$  против 0,0125 в группе ЭАТ). Это, в свою очередь, приводило к снижению аутоантител к тиреопероксидазе:  $D_{450}=3,0$  по сравнению с 19 в экспериментальной группе. Таким образом, сиролимус подавляет активацию аутоиммунного процесса через запуск Т-регуляторного иммунитета.

**Заключение.** Сиролимус способствует снижению уровня аутоиммунной агрессии и улучшению структуры щитовидной железы, что приводит к снижению тяжести заболевания.

**Ключевые слова:** аутоиммунный тиреоидит; лимфоциты; апоптоз; сиролимус; щитовидная железа; экспериментальный аутоиммунный тиреоидит.

## Как цитировать:

Тихонова А.Н., Бурцева А.В., Тихомирова М.В., Абрамова З.И. Влияние ингибитора mTOR на развитие аутоиммунного тиреоидита // Казанский медицинский журнал. 2026. DOI: 10.17816/KMJ642165 EDN: JGADUP

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ642165> EDN: JGADUP

# Effect of mTOR Inhibitor on Autoimmune Thyroiditis

Anastasia N. Tikhonova, Anastasia V. Burtseva, Maria V. Tikhomirova, Zinaida I. Abramova

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** In autoimmune thyroiditis, hormone replacement therapy generally does not inhibit the activity of autoreactive T lymphocytes destroying the thyroid gland and promoting the antithyroid antibody response at the early stages of the disease.

**AIM:** This work aimed to find an approach aimed at suppressing the autoimmune reaction in autoimmune thyroiditis.

**METHODS:** Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) was induced by double (at day 1 and day 14) thyroglobulin immunization of 15 weeks old C57BL/6 mice using complete and incomplete Freund's adjuvant. Experimental animals were given a 0.05% NaI solution during feeding. The mice were divided into three groups; group 1 included intact mice ( $n = 5$ ), group 2 included mice with induced EAT ( $n = 7$ ), and group 3 included mice with induced EAT and subsequently administered sirolimus ( $n = 7$ ). CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, double-positive and double-negative T lymphocytes, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cell levels were determined using flow cytometry. Follicle destruction was measured by hematoxylin and eosin staining and the apoptosis was measured by staining with active caspase-3 antibodies. Thyroid antibodies were determined using enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical processing was performed using one-way ANOVA and Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ); data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Distribution normality was tested using the Shapiro–Wilk and Bartlett tests.

**RESULTS:** In the EAT group, the mTOR protein inhibitor (sirolimus) prevented thymus involution, increased the number of thymic regulatory T cells, and suppressed the secretion of IFN- $\gamma$  and IL-17A cytokines. The inhibitor reduced lymphoid infiltration ( $D_{450} = 0.25$ ) compared to mice with EAT ( $D_{450} = 2.4$ ) and cellular apoptosis ( $D_{450} = 0.005$  vs 0.0125 in the EAT group). This, in turn, resulted in lower levels of thyroid peroxidase autoantibodies ( $D_{450} = 3.0$  compared to 19 in the experimental group). Therefore, sirolimus suppresses the autoimmune reaction by activating regulatory T immunity.

**CONCLUSION:** Sirolimus helps reduce the autoimmune aggression, improve the thyroid gland structure, and mitigate the severity of the disease.

**Keywords:** autoimmune thyroiditis; lymphocytes; apoptosis; sirolimus; thyroid gland; experimental autoimmune thyroiditis.

### To cite this article:

Tikhonova AN, Burtseva AV, Tikhomirova MV, Abramova ZI. Effect of mTOR inhibitor on autoimmune thyroiditis. *Kazan Medical Journal*. 2026. DOI: 10.17816/KMJ642165 EDN: JGADUP

## ОБОСНОВАНИЕ

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) — наиболее распространённое заболевание 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 её дальнейшему разрушению и гипотиреозу [2]. Статистика показала, что среднемировая распространённость АИТ среди взрослого населения составляет 7,5%, а ежегодная заболеваемость — 30–150 случаев на 100 тыс. человек [3].

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

В 2022 году вышла статья О.А. Фроловой и соавт., в которой было представлено исследование, выполненное по материалам официальной статистики РТ за 2014–2019 гг. и отмечена тенденция роста первичной заболеваемости населения РТ болезнями ЩЖ с 177,3 до 273,3 на 100 тыс. 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 врождённой йодной недостаточности, эндемический зоб, связанный с йодной недостаточностью, субклинический гипотиреоз вследствие йодной недостаточности и другие формы гипотиреоза) составила 85,2 на 100 тыс. населения»<sup>1</sup>. В 2023 году данный показатель вновь вырос и достиг 86,4 на 100 тыс. населения. В целом, по данным заместителя начальника отдела надзора по гигиене питания

Управления Роспотребнадзора по РТ Татьяны 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 тыс. человек по сравнению с 2023 годом»<sup>2</sup>. Несмотря на положительную тенденцию, проблема остаётся актуальной.

Заместительная терапия синтетическим тироксином считается общепринятой терапией для пациентов с гипотиреозом [6]. Это связано с тем, что левотироксин является синтетическим аналогом тироксина (Т<sub>4</sub>) — гормона, вырабатываемого ЩЖ, — и его приём восполняет недостаток гормонов ЩЖ 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 приёма левотироксина [10].

Сиролимус — ингибитор киназы mTOR с IC<sub>50</sub> 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.

С другой стороны, киназа mTOR является одной из точек молекулярного взаимодействия путей аутофагии и апоптоза, регулирующего выживание и гибель клеток в стрессовых условиях. Нарушения процессов цитопрокторной аутофагии — механизма, позволяющего клеткам избегать апоптотических сигналов, — в норме способствующие их выживанию, играют важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний и могут приводить к клеточной гибели как в целевых органах, так и в клетках 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.

<sup>1</sup> Киселёва Э. «Йода в воде и почве в РТ недостаточно»: Роспотребнадзор о болезнях из-за йододефицита. В: Татар-информ [Internet]. Казань, 19 июля 2023. Режим доступа: <https://www.tatar-inform.ru/news/ioda-v-vode-i-pocve-v-rt-nedostatochno-rosпотребнадzor-o-boleznyax-iz-za-iododeficyta-5911804> Дата обращения: 28.05.2025.

<sup>2</sup> Баданов Р. «Дефицит йода — причина выкидышей и задержек в развитии»: почему важно есть фрукты и рыбу. В: Татар-информ [Internet]. Казань, 29 апреля 2025. Режим доступа: <https://www.tatar-inform.ru/news/deficit-ioda-privicina-vykidysei-i-zaderzek-v-razvitii-pocemu-vazno-est-frukty-i-rybu-5982456> Дата обращения: 28.05.2025.

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 АИТ, является важной задачей.

**Цель исследования** — поиск подхода, направленного на подавление аутоиммунного процесса при АИТ.

## МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы органов и кровь от мышей с экспериментально индуцированным аутоиммунным тиреоидитом (ЗАТ). Все эксперименты, в которых были использованы мыши, проводили 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]. Самок мышей линии C57BL/6 (n=19) в возрасте 7 нед содержали в условиях SPF в течение 8 нед и случайным образом разделяли на три группы: 1-я — контрольная группа (n=5); 2-я — группа с индукцией ЗАТ без лечения (n=7); 3-я — группа с индукцией ЗАТ в присутствии сиролимуса (рапамуцина; Rapamycin, Servicebio, Китай) (n=7). Для индукции классического ЗАТ мышей иммунизировали тиреоглобулином (100 мкг/мышь), а для повышения иммуногенности белка при кормлении животным давали 0,05% раствор NaI.

После индукции ЗАТ мышам в 3-й группе внутрибрюшинно вводили сиролимус [13], растворённый в PBS (1 мг/кг веса) на 1, 3 и 5-й дни недели в течение 5 нед. Вторая группа в качестве контроля получала такое же количество PBS.

После окончания эксперимента мышей подвергли эктаназии. Щитовидная железа, тимус, селезёнка и периферическая кровь были отобраны для дальнейшего исследования. Кроме того, измеряли массу тела мыши и массу органов (ЩЖ, селезёнка, тимус), а коэффициент органа (вес органа/вес животного) сравнивали 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 гематоксилином и эозином по стандартной методике в четыре этапа:

1) депарафинизация — срезы последовательно выдерживали в растворах ксилола, 95 и 70% этанола (по 5 мин);

2) для ядерной окраски использовали гематоксилин Майера, который даёт элективное окрашивание;

3) цитоплазму окрашивали раствором эозина;

4) дегидратация — срезы последовательно выдерживали по 1–2 мин в растворах 70 и 95% этанола и ксилоле.

По результатам окрашивания оценивали степень мононуклеарной клеточной инфильтрации и разрушения фолликулов [Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit Abcam, Великобритания], что иллюстрировало выраженность воспалительных изменений ЩЖ:

1) индекс патологии 0 — инфильтрация отсутствует, фолликулы ЩЖ не повреждены;

2) индекс патологии 0,5 — поражение от >0 до 10% с определёнными 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 с использованием набора Mouse TPO-Ab (anti-Thyroid Peroxidase) ELISA Kit в соответствии с протоколом производителя (Elabscience, КНР). Для получения плазмы в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой забирали 0,5 мл крови методом пункции сердца. Плазму выделяли центрифугированием (2000 g, 5 мин). В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл стандартов и разведённых образцов; через 30 мин в каждую лунку добавляли 100 мкл биотинилированных антител (инкубация 1 ч), затем последовательно инкубировали с HRP-конъюгированными антителами (100 мкл, 30 мин) и в HRP-субстратом (15 мин) с последующим добавлением стоп-реагента. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм.

Тимус каждой мыши помещали на стерильное клеточное сито с порами 70 мкм. После медленного перемешивания с 20 мл культуральной среды RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной сыворотки фетальной бычьей сыворотки (FBS), тимус механически измельчали. Клеточную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 10 мин, после чего клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов с целью получения суспензии тимоцитов.

Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания, добавляли 0,5 мкл FITC-меченых антител к CD4 и 1 мкл PE-меченых антител к CD8 (Biolegend, США) и инкубировали 10 мин в соответствии с протоколом производителя. Анализ производили методом проточной цитометрии на детекторах FL1 и FL2 проточного цитометра BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения CellQuest. Для каждого варианта анализа учитывали не менее 10 тыс. событий. Мёртвые

клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Определяли долю CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, дважды положительных (DP) и дважды негативных (DN) Т-лимфоцитов.

Для определения регуляторных Т-клеток клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания, добавляли 5 мкл PE-меченых антител к CD4 и FITC-меченых антител к CD25 (Elabscience, Китай) и инкубировали 30 мин. Внутриклеточное окрашивание FoxP3 выполняли с помощью набора FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend, США) и APC-меченых антител к FoxP3 (Elabscience, Китай) согласно протоколу производителя. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 1×FoxP3 Perm Buffer, добавляли 5 мкл конъюгированных с флуорохромом антител против FoxP3 и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. После промывки определяли процент CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток.

Для оценки индукции апоптоза в тимocyтах определяли уровень апоптоза Т-лимфоцитов с использованием набора Annexin V-AF488/PI (Lumiprobe, США) в соответствии с инструкцией производителя. Определяли клетки Annexin V-FITC<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> (поздний апоптоз/некроз). Клетки в концентрации 1×10<sup>6</sup> клеток/мл ресуспендировали в 1×Annexin V-связывающем буфере, инкубировали 10 мин с аннексином V-AF488 и 5 мин с пропидием йодидом при комнатной температуре в темноте.

Селезёнку каждой мыши помещали на стерильное клеточное сито с порами 70 мкм и механически диссоциировали в среде RPMI-1640. Клеточную суспензию центрифугировали (400 g, 10 мин), осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса эритроцитов. Количество клеток подсчитывали после окрашивания трипановым синим и доводили концентрацию до 2×10<sup>6</sup> клеток/тест. Клетки культивировали в течение 5 ч в 24-луночных планшетах (1 мл среды RPMI-1640 на лунку) с добавлением специфических индукторов (eBioscience, США). Процедуру анализа внутриклеточных про- и противовоспалительных цитокинов клеток, включающую этапы фиксации, пермеабилзации и окрашивания специфическими моноклональными антителами к IFN-γ, IL-4 и IL-17A, проводили согласно протоколу производителя. Анализ осуществляли на детекторах FL1, FL2 и FL4 проточного цитометра.

Значимость полученных результатов определяли с помощью анализа ANOVA. Анализ изображений, выявленных методом конфокальной микроскопии, осуществляли с помощью пакета программ Fiji. Для анализа данных цитометрии использовали программу FlowJo. Статистическую обработку данных выполняли посредством программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Результаты выражены как среднее значение величины ± 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

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.

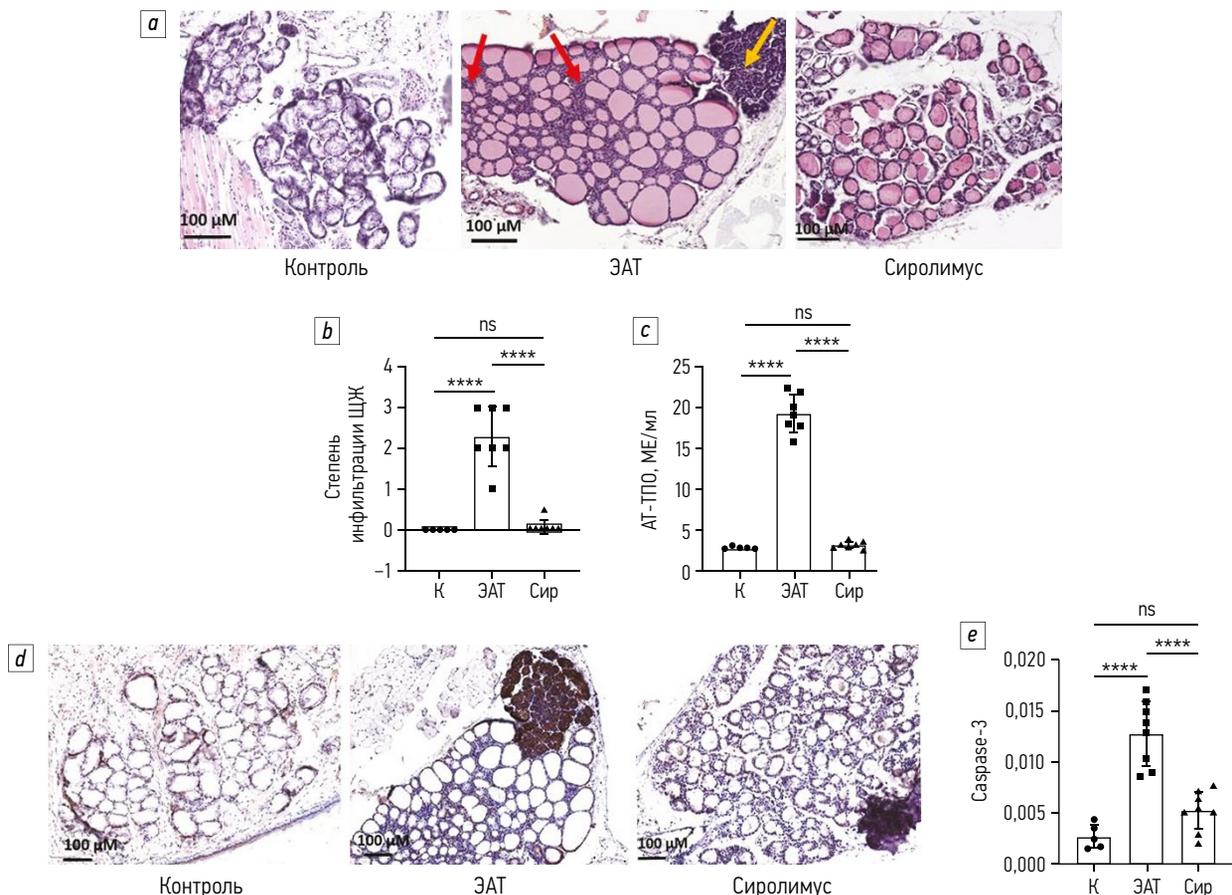
Окрашивание гематоксилином и эозином (рис. 1, а) выявило наличие повышенной лимфоидной инфильтрации ЩЖ и морфологические изменения фолликулов в группе мышей с ЭАТ. Показатель инфильтрации лимфоцитов ( $D_{450}=2,4$ ) у мышей с ЭАТ был значимо выше ( $p < 0,0001$ ), чем у нормальных мышей ( $D_{450}=0,13$ ) и мышей, получавших сиролimus ( $D_{450}=0,25$ ) ( $p < 0,0001$ ) (рис. 1, б). Как следует из данных, представленных на рис. 1, титр анти-ТПО ( $D_{450}=19$ ) в группе мышей с ЭАТ также был значимо повышен ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем ( $D_{450}=2,5$ ). Добавление сиролимуса приводило к значимому снижению ( $p < 0,001$ ) данного показателя до значений, сопоставимых с уровнем контроля ( $D_{450}=3,0$ ) в экспериментальной группе.

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, д, е).

Влияние сиролимуса на тимическую пролиферацию (рис. 1, а) 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 ( $p < 0,05$ ). Использование сиролимуса приводило к увеличению количества DP-клеток в этой группе ( $p < 0,01$ ; рис. 2, б). При этом количество CD4<sup>+</sup>SP-клеток в группе с ЭАТ как по сравнению с контрольной группой, так и с группой мышей, получавших сиролimus, было повышено (рис. 2, с). В свою очередь оценка апоптоза показала, что количество клеток на стадии апоптоза у мышей с ЭАТ по сравнению с контрольной группой снижалось ( $p < 0,05$ ; рис. 3, б).

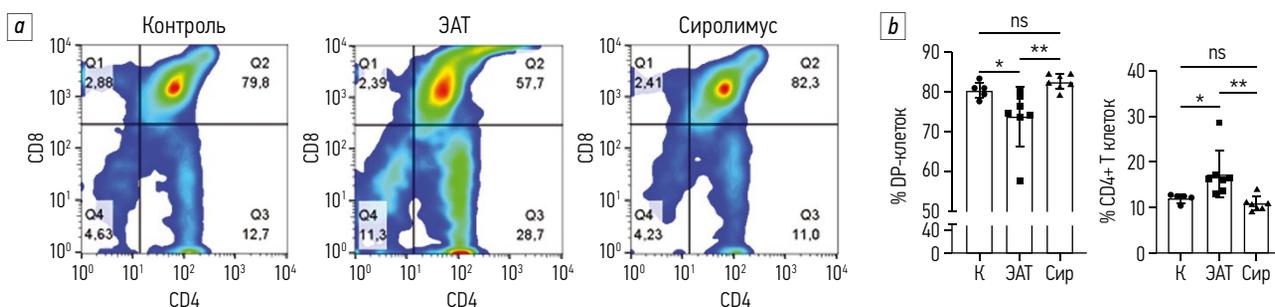
Для идентификации регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) тимocyты мышей окрасили антителами к CD25, CD8 и CD4 перед внутриклеточным окрашиванием Foxp3 (рис. 4) и обнаружили, что экспрессия CD25 и Foxp3 была значительно снижена ( $p < 0,01$ ) в тимусе мышей с ЭАТ по сравнению с контрольными мышами. Добавление сиролимуса приводило к увеличению популяции Treg ( $p < 0,05$ ).

При оценке уровня секреции цитокинов, вырабатываемых Th1, Th2 и Th17, спленоциты предварительно подвергали стимуляции. Клетки стимулировали с помощью РМА и иономицина в присутствии брэфелдина



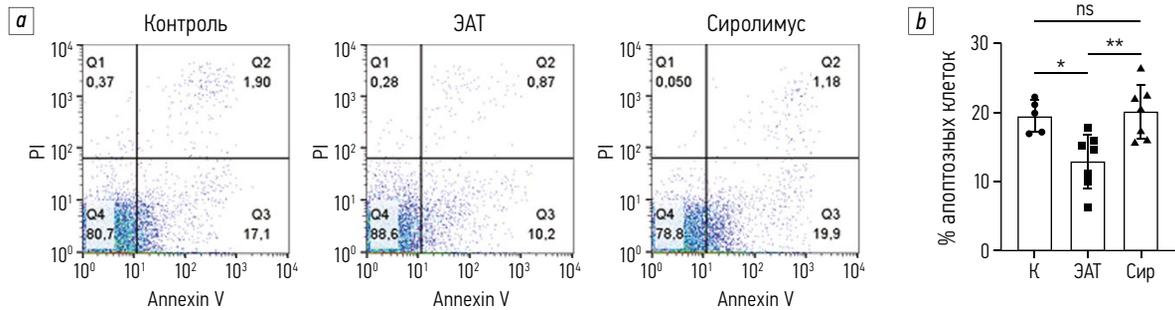
**Рис. 1.** Оценка тяжести аутоиммунного тиреоидита у мышей: *a* — окрашивание гематоксилином и эозином ткани щитовидной железы. Красной стрелкой показана лимфоцитарная инфильтрация, жёлтой стрелкой — разрушенные фолликулы щитовидной железы; *b* — определение уровня лимфоцитарной инфильтрации по средней оптической плотности ( $D_{450}$ ); *c* — уровень антител к тиреоидной пероксидазе в плазме; *d* — иммуногистохимический анализ локализации активной каспазы-3 в ткани щитовидной железы; *e* — средняя оптическая плотность каспазы-3 в фолликулярных клетках щитовидной железы. К — контроль; ЭАТ — экспериментальный аутоиммунный тиреоидит; Сири — сирилимус. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Fig. 1.** Severity of autoimmune thyroiditis in mice: *a*, hematoxylin and eosin staining of thyroid tissue. The red arrow shows lymphocytic infiltration, the yellow arrow shows destroyed thyroid follicles; *b*, lymphocytic infiltration measured by the average absorbance ( $D_{450}$ ); *c*, plasma thyroid peroxidase antibodies; *d*, immunohistochemistry assay of active caspase-3 localization in thyroid tissue; *e*, average absorbance of caspase-3 in follicular cells of the thyroid gland. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



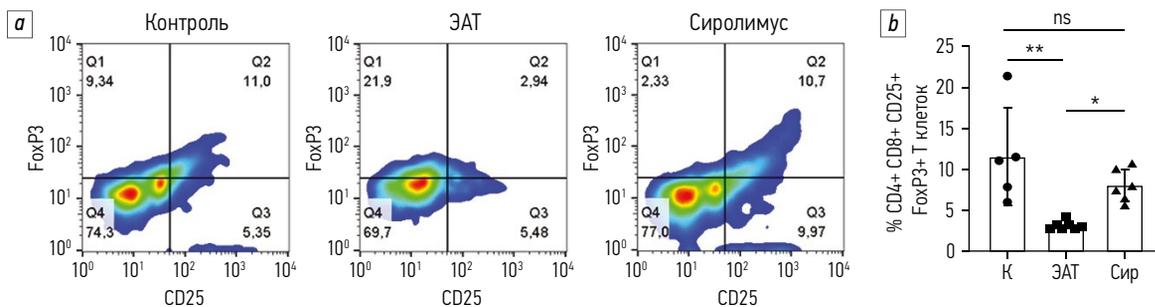
**Рис. 2.** Истощение популяции DP-клеток в тимусе мышей с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом: *a* — репрезентативные графики окрашивания анти-CD4/CD8 тимоцитов контрольных мышей с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом и группы, получавшей сирилимус; *b* — оценка стадий тимопоэтического процесса проточной цитометрией у мышей с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом (красный), группы, получавшей сирилимус (фиолетовый), и контрольной группы (синий). К — контроль; ЭАТ — экспериментальный аутоиммунный тиреоидит; Сири — сирилимус. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

**Fig. 2.** Depletion of DP cells in the thymus of mice with experimental autoimmune thyroiditis: *a*, representative plots of anti-CD4/CD8 staining of thymocytes from control mice with experimental autoimmune thyroiditis and the sirolimus-treated group; *b*, T cell development stages determined by flow cytometry in mice with experimental autoimmune thyroiditis (red), the sirolimus-treated group (purple), and the control group (blue). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Рис. 3.** Анализ уровня апоптоза в тимоицитах с помощью FCM-анализа двойного окрашивания аннексином V/пропидием йодидом (PI): *a* — репрезентативные графики проточной цитометрии; *b* — количество Т-лимфоцитов с признаками апоптоза (Annexin V<sup>+</sup>) от общей популяции клеток (в %). К — контроль; ЭАТ — экспериментальный аутоиммунный тиреозидит; Сир — сиrolимус. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

**Fig. 3.** Analysis of apoptosis in thymocytes by FCM analysis of annexin V/propidium iodide (PI) double staining: *a*, representative flow cytometry plots; *b*, T lymphocytes with signs of apoptosis (annexin V<sup>+</sup>) in the total cell population (in %). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Рис. 4.** Оценка экспрессии CD25 и FoxP3 на тимоицитах: *a* — репрезентативные графики проточной цитометрии; *b* — количество CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> клеток мышей контрольной группы, группы экспериментального аутоиммунного тиреозидита и группы, получавшей сиrolимус. К — контроль; ЭАТ — экспериментальный аутоиммунный тиреозидит; Сир — сиrolимус. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

**Fig. 4.** Evaluation of CD25 and FoxP3 expression in thymocytes: *a*, representative flow cytometry plots; *b*, CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells in mice from the control group, the experimental autoimmune thyroiditis group, and the sirolimus-treated group. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

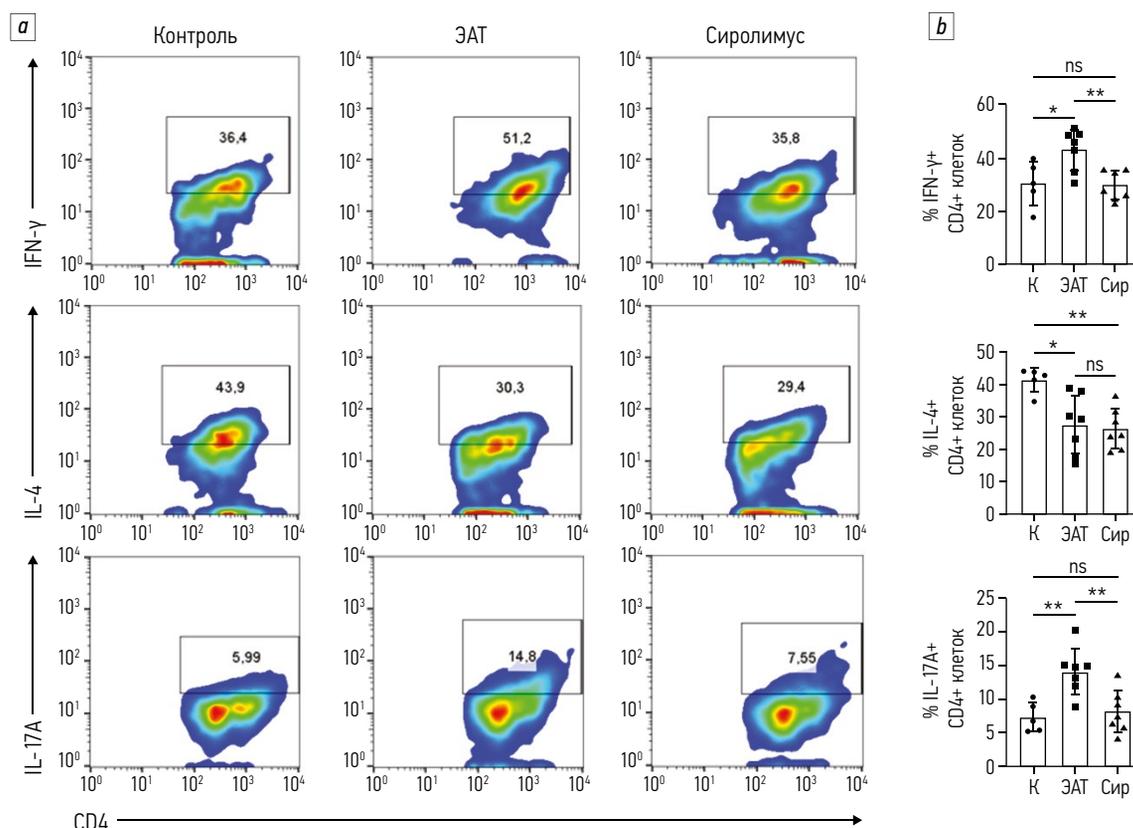
перед окрашиванием внутриклеточных цитокинов на экспрессию IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-17A. В результате выявили повышенную секрецию IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) и IL-17A ( $p < 0,01$ ) в группе мышей с ЭАТ и пониженный уровень секреции IL-4 ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Применение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

## ОБСУЖДЕНИЕ

Инволюция и атрофия тимуса приводят к менее эффективному развитию Т-клеток и созданию ограниченного репертуара периферических Т-клеток. В инволютивном тимусе наблюдается неэффективная центральная толерантность, которая включает 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 [14]. Более того, полученные в данном исследовании результаты подтверждают нарушение негативного отбора и неспособность удалять аутоиммунные Т-клетки на уровне тимусной селекции и устойчивость

Т-клеток внутри железы к апоптозу. Мы показали, что при ЭАТ не наблюдается истощения атрофированного тимуса, что происходит главным образом за счёт 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. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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 и, связываясь с ДНК, ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов. Ранее было установлено, что для CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-клеток характерна высокая экспрессия Foxp3. Предполагается, что Treg-клетки компенсируют недостатки негативного отбора, которые позволяют некоторым аутореактивным Т-клеткам проникать на периферию [15]. Атрофированный тимус теряет способность устанавливать центральную толерантность, что приводит к выходу повышенного количества аутореактивных Т-клеток на периферию и участию в процессе воспаления [16]. В связи с этим в тимусе было определено количество CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> D25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-клеток. Поскольку индукция



**Рис. 5.** Окрашивание  $CD3^+CD4^+$  Т-клеток методом проточной цитометрии на внутриклеточные цитокины: *a* — репрезентативное окрашивание FACS; *b* — количество клеток (в %), синтезирующих IFN- $\gamma$ , IL-4 или IL-17A. К — контроль; ЭАТ — экспериментальный аутоиммунный тиреозит; 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- $\gamma$ , IL-4, or IL-17A. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Foxp3 происходит на стадии DP-клеток, до коммитирования линий  $CD4^+$  или  $CD8^+$  [17], мы анализировали именно эту популяцию. Полученные данные продемонстрировали, что сиролимус 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-клетки, продуцирующие IL-17, играют важную роль в патогенезе псориаза [19].

$CD4^+$  клетки в функциональном отношении делятся на два вида хелперных лимфоцитов: Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ ) и Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13). В основном для Th1- и Th2-клеток характерны ключевые цитокины (IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  и IL-6 при определённой стимуляции [20, 21].

Поэтому была проведена оценка уровня секреции цитокинов, вырабатываемых Th1, Th2 и Th17. Комбинация РМА и иономицина активирует факторы транскрипции NF- $\kappa$ B и NFAT, что приводит к выработке цитокинов, а брефельдин А блокирует везикулярный транспорт, что позволило измерять количество цитокинов внутри клетки [22]. В частности, это дало возможность установить повышенную секрецию IFN- $\gamma$  в группе мышей с ЭАТ и пониженный уровень секреции IL-4 по сравнению с контрольной группой, а применение сиролимуса приводило к подавлению секреции IFN- $\gamma$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование было направлено на изучение эффекта действия сиролимуса на модель ЭАТ. Нарушение механизмов центральной и периферической толерантности играет важную роль в развитии АИТ, в связи с чем было оценено влияние сиролимуса на запуск периферической толерантности, то есть на активацию Т-регуляторного звена иммунитета. При оценке влияния сиролимуса на степень тяжести тиреоидита на мышинной модели ЭАТ обнаружено, что ингибитор снижал степень лимфоидной инфильтрации ЩЖ, уровень антител к тиреоидной

пероксидазе и подавлял апоптоз фолликулярных клеток. Дифференцировка тимоцитов сопровождалась понижением количества DP-клеток и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток при ЭАТ, что свидетельствует об инволюции тимуса. Применение сиролимуса приводило к увеличению DP-клеток и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток и снижению секреции основных провоспалительных цитокинов — IFN- $\gamma$  и IL-17A.

Таким образом, сиролимус снижает уровень воспаления (уровень лимфоцитарной инфильтрации, аутоантител к тиреоидной пероксидазе, провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-17A) и апоптоза ЩЖ при ЭАТ, предотвращает инволюцию тимуса (увеличивается количество DP-клеток тимических T-регуляторных клеток при ЭАТ), а также подавляет активацию аутоиммунного ответа через запуск T-регуляторного иммунитета за счёт увеличения количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg-клеток при АИТ.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** Т.А.Н. — проведение исследования, работа с данными; Б.А.В. — проведение исследования, работа с данными, пересмотр и редактирование рукописи; Т.М.В. — проведение исследования, работа с данными, пересмотр и редактирование рукописи; А.З.И. — работа с данными, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Этическая экспертиза.** Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 49 от 27.07.2024). Тема: «Исследование терапевтического эффекта рапамидина на мышинной модели экспериментального аутоиммунного тиреоидита», запланированно для проведения на базе отдела доклинических исследований НОЦ фармaceutики КФУ в 2024 году в рамках РНФ 22-213. Протокол исследования зарегистрирован локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 37), дата подачи на рассмотрение 20 июня 2025 г.

**Источники финансирования.** Исследование проведено с использованием денежных средств гранта Российского научного фонда (грант РНФ № 23-25-00443). Финансирующие организации не устанавливали ограничений на использование данных и распространение результатов исследования.

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

**Оригинальность.** При создании настоящей работы использована таблица, заимствованная из работы А.М. Хакимова [Хакимова А.М. Эндемические болезни в Татарии как гигиеническая проблема // Казанский медицинский журнал. 1987. Т. 68, № 5. С. 325–328. doi: 10.17816/kazmj96484] (распространяется на условиях лицензии CC-BY 4.0).

**Доступ к данным.** Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

**Генеративный искусственный интеллект.** При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

**Рассмотрение и рецензирование.** Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена в соответствии с процедурой fast-track. В рецензировании участвовали три внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Author contributions:** T.A.N.: investigation, data curation; B.A.V.: investigation, data curation, writing—review & editing; T.M.V.: investigation, data curation, writing—review & editing; A.Z.I.: data curation, writing—original draft; writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that issues related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Ethics approval:** The study was approved by the Local Ethics Committee of the Kazan Federal University (Minutes No. 49 dated July 27, 2024). The topic (“Study of rapamycin effect in a mouse model of experimental autoimmune thyroiditis”) was scheduled for research at the Preclinical Trial Department of the Pharmaceuticals Research and Training Center of the Kazan Federal University in 2024 under RNF 22-213. The study protocol was submitted on June 20, 2025, and registered by the Local Ethics Committee of the Kazan Federal University (Minutes No. 37).

**Funding sources:** The study was funded by a grant from the Russian Science Foundation (RSF grant No. 23-25-00443). The funding organizations imposed no restrictions on data utilization or the dissemination of study findings.

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

**Statement of originality:** This paper used a table from a study by A.M. Khakimova [A.M. Khakimova. Endemic diseases in Tatarstan as a hygiene issue. *Kazan Medical Journal*. 1987;68(Pt 5):325–328. doi: 10.17816/kazmj96484 (In Russ.)]. Distributed under the CC BY 4.0 license.

**Data availability statement:** All data generated during this study are available in this article.

**Generative AI:** No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

**Provenance and peer-review:** This paper was submitted unsolicited and reviewed following the fast-track procedure. The peer-review process involved three external reviewers, a member of the Editorial Board, and the in-house science editor.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Boutzios G, Koukouloti E, Goules AV, et al. Hashimoto thyroiditis, anti-parietal cell antibodies: associations with autoimmune diseases and malignancies. *Front endocrinol*. 2022;(13):860880. doi: 10.3389/fendo.2022.860880 EDN: DHQORA
- Ralli M, Angeletti D, Fiore M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun Rev*. 2020;19(10):102649. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102649 EDN: KALYTE
- Kazakova MP, Tskaeva AA, Starostina EA, Troshina EA. Autoimmune thyroiditis—what's new? *Clin Exp Thyroidol*. 2023;19(4):4–12. doi: 10.14341/ket12781 EDN: TCGYTO
- Khakimova AM. Endemic diseases in Tataria as a hygienic problem. *Kazan medical journal*. 1987;68(5):325–328. doi: 10.17816/kazmj96484
- Frolova OA, Tafeeva EA, Frolov DN, Yangirova EK. Retrospective analysis of the incidence rate of the population in the republic of Tatarstan with diseases of the endocrine system. 2022;30(5):795–800. doi: 10.32687/0869-866X-2022-30-5-795-800 EDN: WULVSY
- Fadeev VV. Principles of substitution therapy. *Consilium Medicum*. 2014;16(4):48–50. (In Russ.) EDN: SFERRD
- Manuylova YuA, Morgunova TB, Fadeyev VV. Causes of treatment failure in primary hypothyroidism. *Clinical and experimental thyroidology*. 2019;15(1):12–18. doi: 10.14341/ket10163 EDN: XCQUBZ

8. Antonelli A, Benvenega S. Editorial: The Association of other autoimmune diseases in patients with thyroid autoimmunity. *Front Endocrinol.* 2018;9:540. doi: 10.3389/fendo.2018.00540
9. Cappellacci F, Canu GL, Lai ML, et al. Association between hashimoto thyroiditis and differentiated thyroid cancer: A single-center experience. *Front Oncol.* 2022;12:959595. doi: 10.3389/fonc.2022.959595 EDN: CPWPLT
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. *Curr Med Res Opin.* 2022;38(11):1865–1870. doi: 10.1080/03007995.2022.2071059 EDN: ENVYEQ
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 EDN: ECFULY
12. Suto T, Karonitsch T. The immunobiology of mTOR in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2020;110:102373. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102373 EDN: SAHIZU
13. Wen HY, Wang J, Zhang SX, 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. *J Immunol Res.* 2019;2019:7684352. doi: 10.1155/2019/7684352
14. Thomas R, Wang W, Su DM. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing.* 2020;17:2. doi: 10.1186/s12979-020-0173-8 EDN: HOGYYQ
15. Delfino DV, Pozzesi N, Pierangeli S, et al. Manipulating thymic apoptosis for future therapy of autoimmune diseases. *Curr Pharm Des.* 2011;17(29):3108–3119. doi: 10.2174/138161211798157621 EDN: PMSIGF
16. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, et al. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009;30(7):366–373. doi: 10.1016/j.it.2009.04.003
17. Burger ML, Leung KK, Bennett MJ, Winoto A. T cell-specific inhibition of multiple apoptotic pathways blocks negative selection and causes autoimmunity. *Elife.* 2014;3:e03468. doi: 10.7554/eLife.03468
18. Nunes-Cabaço H, Caramalho I, Sepúlveda N, Sousa AE. Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *Eur J Immunol.* 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. *Pharmacol Rev.* 2015;67(2):280–309. doi: 10.1124/pr.114.009639 EDN: UOIXZJ
20. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. 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 RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine.* 2015;72(2):146–153. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.027
22. Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar BS. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(10):721–731. doi: 10.1089/jir.2011.0049

## ОБ АВТОРАХ

\* **Абрамова Зинаида Ивановна**, д-р биол. наук, профессор, каф. биохимии, биотехнологии и фармакологии; адрес: Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18; ORCID: 0000-0003-3749-3411; eLibrary SPIN: 5293-9741; e-mail: ziabramova@mail.ru

**Тихонова Анастасия Николаевна**, студент, каф. биохимии, биотехнологии и фармакологии; eLibrary SPIN: 6842-5993; e-mail: askatix@mail.ru

**Бурцева Анастасия Владимировна**, выпускник, каф. биохимии, биотехнологии и фармакологии; e-mail: renardtriste00@gmail.com

**Тихомирова Мария Владимировна**, канд. биол. наук, старший преподаватель, каф. биохимии, биотехнологии и фармакологии; ORCID: 0000-0001-9357-3649; eLibrary SPIN: 4208-9021; e-mail: MVTikhomirova@kpfu.ru

## AUTHORS INFO

\* **Zinaida I. Abramova**, Dr. Sci. (Biology), Professor, Depart. of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology; address: 18 Kremlyovskaya st, Kazan, Russia, 420008; ORCID: 0000-0003-3749-3411; eLibrary SPIN: 5293-9741; e-mail: ziabramova@mail.ru

**Anastasia N. Tikhonova**, student, Depart. of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology; eLibrary SPIN: 6842-5993; e-mail: askatix@mail.ru

**Anastasia V. Burtseva**, Graduate student, Depart. of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology; e-mail: renardtriste00@gmail.com

**Maria V. Tikhomirova**, Cand. Sci. (Biology), Senior Lecturer, Depart. of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology; ORCID: 0000-0001-9357-3649; eLibrary SPIN: 4208-9021; e-mail: MVTikhomirova@kpfu.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author