

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА ПРОЦЕССЫ РЕМИЕЛИНИЗАЦИИ

© Дмитрий Александрович Качанов, Галина Яковлевна Лапкина

Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

Контактная информация: Дмитрий Александрович Качанов — студент 6 курса лечебного факультета. E-mail: Dmitrii.Kachanov@szgmu.ru

АННОТАЦИЯ. В настоящее время наблюдается увеличение числа заболеваний, сопровождающихся демиелинизирующими поражениями ЦНС. Наиболее социально значимым и наименее изученным среди них является рассеянный склероз. Поиск соединений, которые препятствовали бы демиелинизации, либо усиливали процесс ремиелинизации, является актуальным. Гормоны щитовидной железы играют значительную роль в развитии и функционировании структур нервной системы. Ряд исследователей считают, что трийодтиронин регулирует синтез миелина через ядерные рецепторы к тиреоидным гормонам. В нашем исследовании процессы демиелинизации мы смоделировали с помощью купризоновой модели, которая представляется наиболее оптимальным методом, так как позволяет рассмотреть процесс демиелинизации в отсутствии аутоиммунного компонента. Результаты исследования показали высокие миелино- и аксопротективные свойства гормональных препаратов щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиреоидный статус, демиелинизация, купризон, рассеянный склероз.

EFFECT OF THYROID STATUS ON REMYELINATION PROCESSES

© Dmitrii A. Kachanov, Galina Ya. Lapkina

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 195067, St. Petersburg, Piskaryovskiy pr., 47

Contact Information: Dmitrii A. Kachanov — 6th year student of the Faculty of Medicine. E-mail: Dmitrii.Kachanov@szgmu.ru

ABSTRACT. The number of demyelinating diseases of central nervous system are prone to grow nowadays. The most socially significant and well studied one is multiple sclerosis. The search of substances that would stop demyelination or reinforce the process of remyelination is in great request. Thyroid gland hormones play a sufficient role in nervous system functioning and developing. Some studies show, that triiodothyronine regulates myelin synthesis through thyroid-sensitive nuclear receptors. In our study process of demyelination were modelled via cuprizone model, which appears to be an optimal method, since it allows to witness the process of demyelination without an autoimmune component. Results of the study show effectiveness of thyroid hormones for myelin and axon protection.

KEY WORDS: thyroid status, demyelination, cuprizone, multiple sclerosis.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время наблюдается увеличение числа заболеваний, сопровождающихся демиелинизирующими поражениями ЦНС.

Наиболее социально значимым и наименее изученным среди других заболеваний нервной системы является рассеянный склероз (РС), возникающий чаще всего в молодом и среднем возрасте и имеющий аутоиммунный

характер течения заболеваний. РС одновременно поражает несколько отделов ЦНС, что приводит к инвалидизации пациентов, ухудшению качества их жизни, а также затрудняет диагностику. При данном заболевании страдает не только белое, но и серое вещество, а демиелинизация серого вещества имеет связь с клиническим состоянием пациентов.

На сегодняшний день препараты для лечения РС направлены на снятие симптомов, облегчение проявления болезни и на продление периода ремиссии, однако они не восстанавливают пораженные участки мозга и полностью не излечивают данное заболевание. Поиск соединений, которые препятствовали бы демиелинизации, либо усиливали процесс ремиелинизации, является актуальным [1].

Гормоны щитовидной железы играют значительную роль в развитии и функционировании структур нервной системы. Тиреоидные гормоны способствуют развитию коры больших полушарий и мозжечка у плода, стимулируют рост нейронов переднего мозга, аксонов, дендритов, их миелинизацию [2, 3]. При возникновении дефицита трийодтиронина ученые отмечают нарушения в формировании внеклеточного матрикса, что приводит к расстройствам нейрональной миграции клеток в процессе развития мозга [4]. В ходе многих экспериментов установлено влияние гормонов щитовидной железы на процессы дифференцировки и созревания различных подтипов олигодендроцитов и астроцитов [10, 11]. Реализация данных эффектов осуществляется через ядерные рецепторы к трийодтиронину. В высоких концентрациях они представлены в нейронах миндалевидного тела и гиппокампа, а также коре головного мозга, в меньшей степени в стволе и мозжечке.

Ряд ученых рассматривают процесс миелинизации как ТЗ-опосредованную активацию глии [2]. Трийодтиронин, по их мнению, регулирует не только дифференцировку олигодендроцитов, но и синтез миелина через ядерные рецепторы к тиреоидным гормонам. Предполагается, что при гипофункции щитовидной железы тормозится экспрессия генов, кодирующих синтез структурных белков миелина: основного белка миелина, протеолипидного белка, миелин-ассоциированного гликопротеина, что приводит к снижению продукции миелина и числа миелинизированных аксонов [2, 10, 11].

Модели на животных помогают понять сложное взаимодействие между типами раз-

личных клеток ЦНС и выявить общие механизмы повреждения и восстановления оболочек миелина. Существуют четыре хорошо охарактеризованных экспериментальных подхода к индуцированию демиелинизации ЦНС у грызунов:

- генетические мутации миелина;
- аутоиммунная воспалительная демиелинизация (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит);
- вирусная демиелинизация;
- токсическая демиелинизация.

В последние годы большое внимание и признание привлекло купризон-индуцированное поражение. Эта модель является токсичной моделью демиелинизации белого и серого вещества в ЦНС, в котором отсутствует аутоиммунный компонент. Купризон индуцирует апоптоз зрелых олигодендроцитов, что приводит к устойчивой демиелинизации и к активации астроцитов и микроглии с региональной гетерогенностью между различными областями серого и белого вещества. Эта модель является чрезвычайно полезной для уточнения механизмов во время де- и особенно ремиелинизации независимо от взаимодействия с периферическими аутоиммунными клетками. При регулярном введении купризона ремиелинизация прерывается и демиелинизация сохраняется до конца диеты (хроническая демиелинизация) [2].

Цель исследования — исследование влияния гормонов щитовидной железы на процессы ремиелинизации у крыс в купризоновой модели рассеянного склероза в сравнении с процессом гипотиреоза.

Задачи:

- воспроизведение модели рассеянного склероза у крыс посредством купризона;
- изучение влияния препаратов щитовидной железы на процессы ремиелинизации;
- изучение влияния гипотиреоидной патологии в купризоновой модели рассеянного склероза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись половозрелые крысы-самцы (4-4,5 мес.) массой 180-300 г. линии Wistar (n=35). Эксперимент проводился на базе кафедры фармакологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. Все экспериментальные процедуры осуществлялись в соответствии с

правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Животные были разделены на 4 группы (таблица 1):

I группа — “Контроль” (n=5);

II группа — “Демиелинизация” (только купризон, n=10);

III группа — “L-тироксин” (купризон + L-тироксин, n=10);

IV группа — “Гипотиреоз” (купризон + пропилтиоурацил, n=10).

В ходе эксперимента животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария со свободным доступом к воде и пище при световом режиме 12/12.

Демиелинизацию вызывали хроническим пероральным введением 0,3% водного раствора купризона, который давали крысам вместо питья в течение 3 недель. Для оценки влияния гормонов щитовидной железы III группа животных получала L-тироксин в дозе 1,5 мкг/кг. Для создания экспериментального гипотиреоза нами была использована пропилтиоурациловая модель. Пропилтиоурацил (ПТУ) применяли в виде 0,02%-ного водного раствора. По расчетным данным каждое животное получало примерно 0,78 мг ПТУ на 100 г массы тела в сутки.

Таблица 1.

Исследуемые группы.

Группа	n	Описание
Контроль (I)	5	Животные, получающие обычную воду
Демиелинизация (II)	10	Животные, получающие вместо питья 0,3% р-р купризона
L-тироксин (III)	10	Животные, получающие вместо питья 0,3% р-р купризона, которым внутрибрюшинно вводился L-тироксин в дозе 1,5 мкг/кг
Гипотиреоз (IV)	10	Животные, получающие 0,02% водный раствор пропилтиоурацила

Подопытных животных взвешивали до начала исследования и через 7, 14 и 21 сутки после начала приема купризона, поскольку потеря веса — одно из проявлений токсического влияния купризона на организм животных. Одновременно взвешивали крыс контрольной группы. Установлено, что после завершения приема купризона крысы всех исследуемых групп теряли в весе ($p<0,05$).

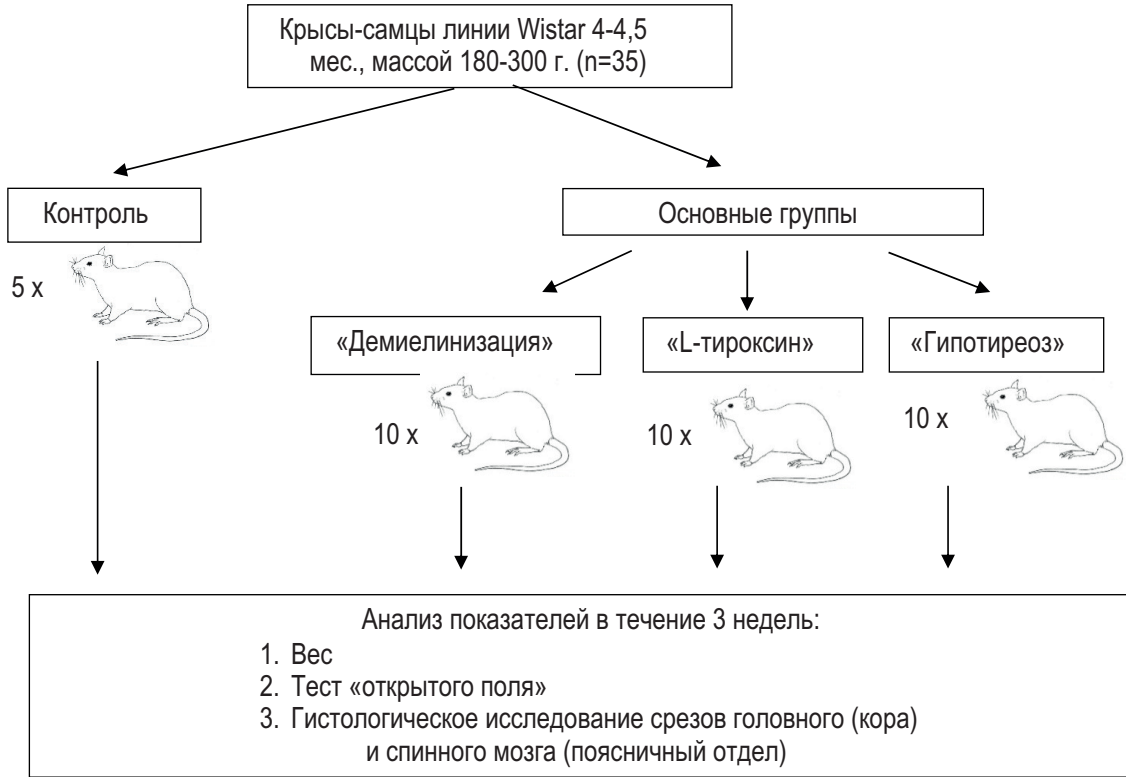


Рис. 1. Дизайн исследования

Для изучения поведенческих реакций у животных использовался тест «открытого поля», который является одним из адекватных критериев оценки двигательных нарушений при использовании нейротоксинов, в том числе купризона [4]. Тест также дает возможность оценить у животных исследовательскую и эмоциональную активность. У крыс в течение трех минут регистрировали количество пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность, ГДА), вертикальных стоек с опорой и без опоры на стенку (вертикальная двигательная активность, ВДА), норковый рефлекс, эмоциональное поведение. Норковый рефлекс вместе с ВДА характеризует исследовательскую деятельность животного. Поведение оценивали до и через три недели после употребления купризона.

Для морфологических исследований ЦНС использовались гистологические срезы головного (кора) и спинного мозга (поясничный отдел) толуидиновым синим (по Нисслю). Данный краситель связывается с мембранными структурами, что позволяет на уровне световой микроскопии диагностировать состояние ядра и цитоплазмы нейронов, а именно хроматофильной субстанции. При данном анализе мы определяли долю неизмененных нейронов и долю нейронов с различными структурными изменениями, которые проявлялись в виде изменений формы тела и ядра нейрона, особенностей размещения хромато-

фильной субстанции. Все структурные изменения могут быть подразделены на умеренные и выраженные. Умеренные нарушения характеризуются смещением ядрышка к ядерной оболочке и увеличением размеров ядра, гипохромной цитоплазмой, хроматофильное вещество не определяется. Выраженные нарушения нейронов — это деструктивные изменения, характеризующиеся уменьшением размеров ядра с контурами неправильной формы, без визуализированного ядрышка.

Морфологические исследования у исследуемых групп крыс проводились через три недели после начала эксперимента.

При статистическом анализе результатов использовали t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс основных исследуемых групп выявлены отклонения исходного поведения от контрольной группы. После приема купризона у крыс групп «Демиелинизация» и «Гипотиреоз» угнетались практически все исследованные поведенческие реакции (ГДА, ВДА, исследовательская и эмоциональная активность). Особенно выраженным было снижение в группе «Гипотиреоз» (рис. 2–4).

По данным многих исследований полагаются, что при гипофункции щитовидной железы тормозится экспрессия генов, кодирующих синтез структурных белков миелина: ос-

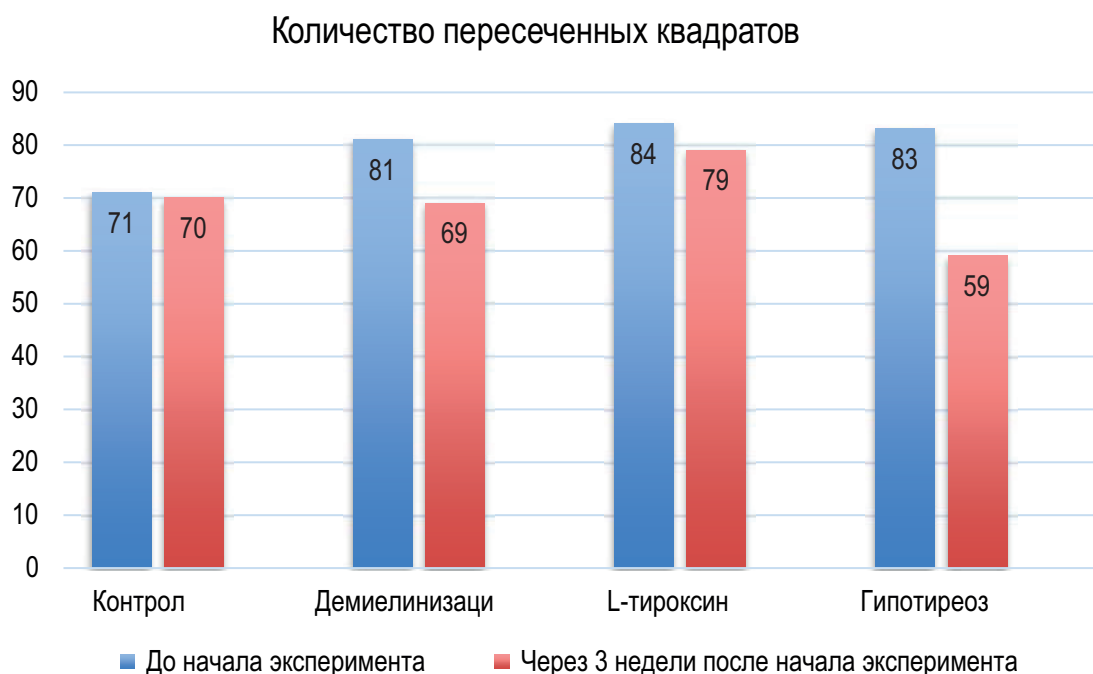


Рис. 2. Влияние купризона на показатель «количество пересеченных квадратов» в тесте «открытое поле»

нового белка миелина, протеолипидного белка, миелин-ассоциированного гликопротеина, что приводит к снижению продукции миелина и числа миелинизированных аксонов. В связи с этим может быть связаны такие изменения у крыс в группе «Гипотиреоз».

После приема купризона в сером веществе головного и спинного мозга крыс в группах «Демиелинизация», «L-тироксин» и «Гипотиреоз» были выявлены структурные изменения в нейронах. Наиболее выраженные изменения

обнаружились в группе «Гипотиреоз», наименее — в группе «L-тироксин». При морфометрическом анализе было установлено, что структурные изменения нейронов ЦНС подопытных крыс имели разный характер — от умеренных до выраженных (деструктивных) (табл. 2).

Значительные повреждения нейронов, которые характеризуют апоптоз, мы наблюдали в группе «Гипотиреоз», что указывает на более глубокие патологические изменения клеток.

Вертикальные стойки

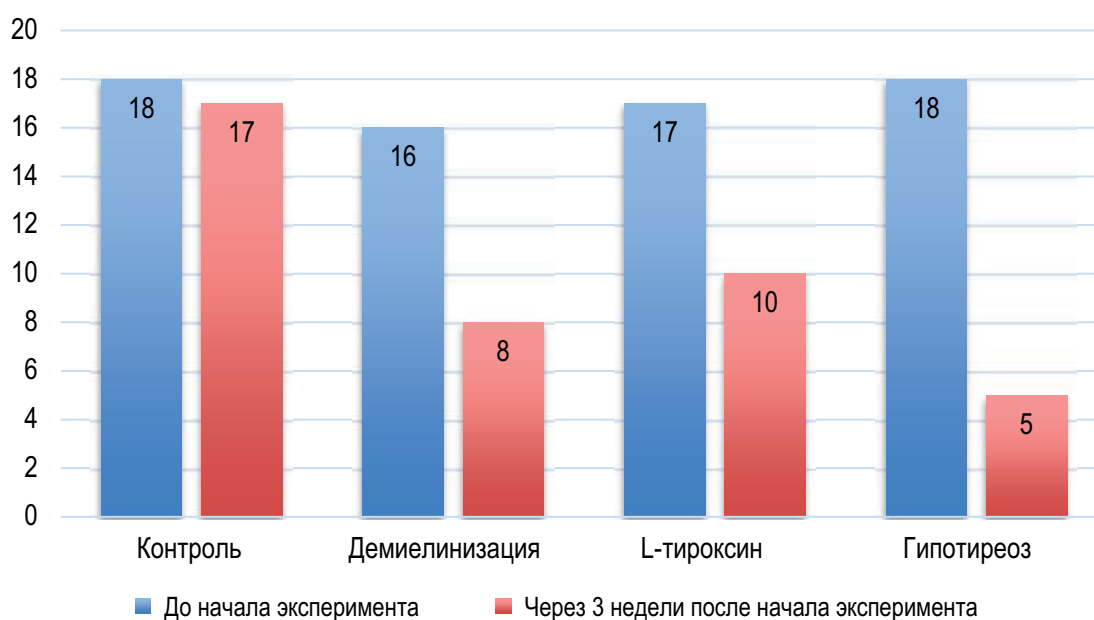


Рис. 3. Влияние купризона на показатель «вертикальные стойки» в тесте «открытое поле»

Заглядывание в норки

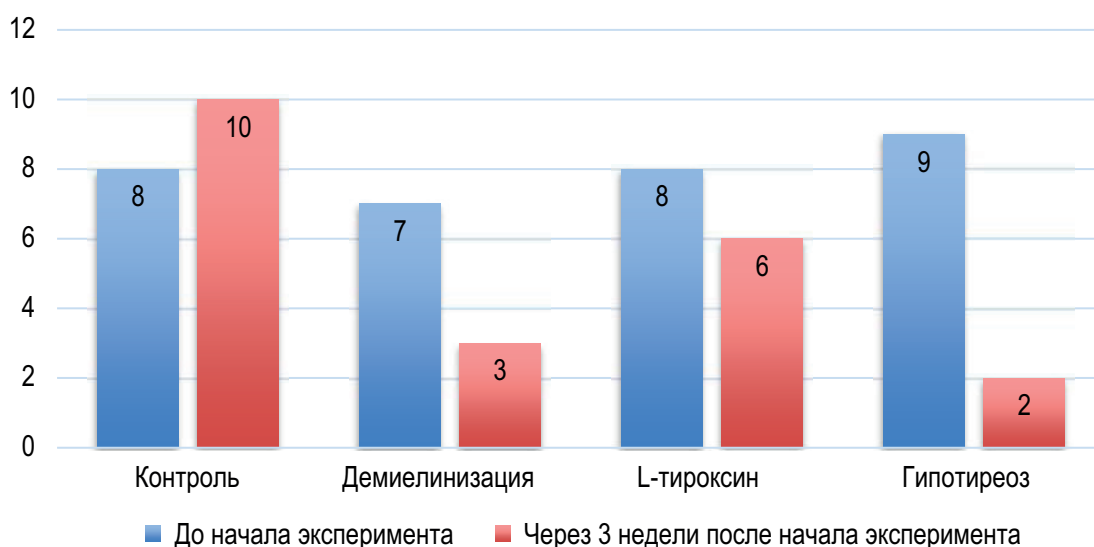


Рис. 4. Влияние купризона на показатель «заглядывание в норки» в тесте «открытое поле»

Таблица 2

Морфологические изменения головного и спинного мозга у крыс
через 3 недели после начала эксперимента

Исследуемые группы	Неизмененные нейроны, %	Нейроны с умеренными изменениями, %	Нейроны с деструктивными изменениями, %
Кора головного мозга			
«Контроль»	95	5	0
«Демиелинизация»	55	40	5
«L-тироксин»	68	31	1
«Гипотиреоз»	43	50	7
Спинной мозг (поясничный отдел)			
«Контроль»	95	5	0
«Демиелинизация»	78	20	2
«L-тироксин»	80	20	0
«Гипотиреоз»	60	35	5

Дегенерация нейронов в данном случае может быть связана с активацией микроглии, секретирующей провоспалительные цитокины, являющиеся патогенетическим звеном рассеянного склероза. Также имеет место развитие оксидативного стресса в нервной системе.

Результаты морфологических исследований у крыс в значительной степени согласуются с данными оценки поведенческих реакций, что связано с физиологическими характеристиками тех отделов ЦНС, которые были исследованы в данной работе. В обеспечении двигательной активности мотонейроны спинного мозга взаимодействуют с корой головного мозга. Результатами нарушения функционирования коры головного мозга являются изменения ГДА и ВДА. Также кора головного мозга вместе с гипоталамусом и лимбической системой является главным компонентом эмоционального проявления поведенческих реакций. Таким образом, можно считать, что проявления двигательных нарушений и эмоционального поведения, которые развиваются в условиях приема купризона, являются результатом не только демиелинизации ЦНС, но и связаны с повреждением нейронов головного и спинного мозга.

В данной работе мы увидели, что крысы, получавшие одновременно купризон и L-тироксин, имели более высокие показатели в поведенческих реакциях и имели меньше морфологических изменений головного и спинного мозга по сравнению с группами «Демиелинизация» и «Гипотиреоз». Данный факт может свидетельствовать о миелино- и аксонопротективных свойствах данного вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У крыс под влиянием купризона угнетаются поведенческие реакции и отмечаются изменения в структурах нейронов коры головного мозга и поясничного отдела спинного мозга. Выраженность этих нарушений также зависит от тиреоидного статуса организма крысы. В нормальном гормональном балансе отмечаются менее значимые изменения, когда в состоянии гипофункции эти нарушения более выражены. Купризонная модель демиелинизации является адекватной экспериментальной моделью нейродегенерации и нарушений поведения, а гормональные препараты щитовидной железы могут рассматриваться как один из компонентов новых лекарств, направленных на лечение рассеянного склероза.

ЛИТЕРАТУРА

- Накесбекова А. Исследование влияния эстрадиола, инсулиноподобного фактора роста-1 и бетамида на миелинизацию мозга мышей в купризонной модели рассеянного склероза. Магистерская диссертация: 06.04.01; [Томск, НИ ТГУ]. Томск; 2017: 67.
- Лабунец И.Ф., Мельник Н.А., Кузьминова И.А. Изменения поведенческих реакций и структуры нейронов центральной нервной системы у мышей при купризонной модели демиелинизации. Интер-медикал. 2014; 5: 25–31.
- Амикишиева А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование. Вестник ВОГиС. 2009; 13(3): 529–42.
- Лабунец И.Ф., Мельник Н.А., Кузьминова И.А., Бутенко Г.М. Способ моделирования структурных изменений нейронов центральной нервной системы при демиелинизирующих заболеваниях. Патент

- № 94458 u UA МПК G09B 23/28 (2006.01). заявл. 13.06.2014 р., опубл. 10.11.2014. Бюл. № 21. 3 с.
5. Мельник Н. А. Структура некоторых органов нервной и иммунной систем в условиях демиелинизации и ремиелинизации. Автореф. дисс... д -ра мед. наук. 2005.
6. Пивнева Т.А. Механизмы демиелинизации при рассеянном склерозе. Нейрофизиология. 2009; 41(5): 429–37.
7. Пишель И. Н., Дубилей Т. А., Рущкевич Ю. Е. Полиморфизм возрастных иммунологических, эндокринных и нейрохимических изменений у мышей разных линий. Пробл. старения и долголетия. 2006; 15(4): 310–18.
8. Суслина З. А., Завалишин И. А. Рассеянный склероз: от представлений о патогенезе к лечению. Неврологический вестник. 2010; 1: 6–8.
9. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации. Под общ. ред. Ю. Б. Белоусова. М.; 2005: 156.
10. Acs P., Kalman B. Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. Methods Mol Biol. 2012; 900: 403–31.
11. Franco-Pons N., Torento M., Colomina M.T., Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizoneinduced murine model of dymyelination/remyelination. Toxicology Letters. 2007; 169(3): 205–13.
12. Kipp M1., Clarner T., Dang J., Copray S., Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta Neuropathol. 2009; 118(6): 723–36.
3. Amikishieva A. V. Povedencheskoe fenotipirovanie: sovremennye metody i oborudovanie. [Behavioral phenotyping: modern methods and equipment]. Vestnik VOGiS. 2009; 13(3): 529–42. (in Russian).
4. Labunec I.F., Mel'nik N.A., Kuz'minova I.A., Butenko G.M. Sposob modelirovaniya strukturnykh izmenenij neyronov central'noj nervnoj sistemy pri demieliniziruyushchih zabolevaniyah. [A method for modeling structural changes in neurons of the central nervous system in demyelinating diseases]. Patent № 94458 u UA МПК G09B 23/28 (2006.01). заявл. 13.06.2014 р., опубл. 10.11.2014. Бюл. № 21. 3 с. (in Russian).
5. Mel'nik N. A. Struktura nekotorykh organov nervnoj i immunnoj sistem v usloviyah demielinizacii i remielinizacii. [The structure of some organs of the nervous and immune systems in conditions of demyelination and remyelination]. Avtoref. diss... d -ra med. nauk. 2005. (in Russian).
6. Pivneva T.A. Mekhanizmy demielinizacii pri rasseyannom skleroze. [The mechanisms of demyelination in multiple sclerosis]. Neirofiziolgiya. 2009; 41(5): 429–37. (in Russian).
7. Pishel' I. N., Dubilej T. A., Rushkevich YU. E. Polimorfizm vozrastnykh immunologicheskikh, endokrinnykh i neirohimicheskikh izmenenij u myshej raznykh linij. [Polymorphism of age-related immunological, endocrine and neurochemical changes in mice of different lines]. Probl. starenia i dolgoletiya. 2006; 15(4): 310–18. (in Russian).
8. Suslina Z. A., Zavalishin I. A. Rasseyannyj skleroz: ot predstavlenij o patogeneze k lecheniyu. [Multiple sclerosis: from perceptions of pathogenesis to treatment]. Nevrologicheskij vesnik. 2010; 1: 6–8. (in Russian).
9. Eticheskaya ekspertiza biomedicinskih issledovaniy. [Ethical Examination of Biomedical Research]. Prakticheskie rekomendacii. Pod obshch. red. YU. B. Belousova. M.; 2005: 156. (in Russian).
10. Acs P., Kalman B. Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. Methods Mol Biol. 2012; 900: 403–31.
11. Franco-Pons N., Torento M., Colomina M.T., Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizoneinduced murine model of dymyelination/remyelination. Toxicology Letters. 2007; 169(3): 205–13.
12. Kipp M1., Clarner T., Dang J., Copray S., Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta Neuropathol. 2009; 118(6): 723–36.

REFERENCES