

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ТИРОЦИТОВ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Полякова Л.В.¹, Калашникова С.А.¹, Газарян К.Э.¹, Ваниев А.Г.¹, Фогель А.В.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, Пятигорск, e-mail: ar.vaniew@yandex.ru

При наличии хронической печеночной недостаточности, на фоне цирроза печени развивается хроническая эндогенная интоксикация, что вовлекает в патологический процесс различные органы, включая щитовидную железу. Хроническое повреждение ткани щитовидной железы приводит к изменению адаптационных возможностей и может сопровождаться перестройкой паренхимы за счет пролиферации тироцитов. Целью исследования является определение закономерности распределения специфических маркеров пролиферации тироцитов при циррозе печени. Для исследования был использован аутопсийный материал 32 лиц мужского пола (ткань печени и щитовидной железы) с последующим стандартным гистологическим исследованием различных зон щитовидной железы. В дальнейшем проводили иммуногистохимическое исследование ткани щитовидной железы с использованием поликлональных антител специфичных факторов транскрипции тироцитов: тиреоидного фактора транскрипции (ТТФ-1) и фактора, кодирующего гены Pax8 (Pairedbox 8). По результатам исследования было установлено, что наибольшее количество иммунопозитивных клеток располагалось в нижней доле щитовидной железы, преимущественно в экстрафолликулярном эпителии. Анализ морфометрических критериев пролиферативной активности клеток выявил увеличение площади ядер тироцитов центральной и периферической зон, а также преобладание иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 и Pax8 в центральной зоне. Таким образом, наиболее активные пролиферативные участки были выявлены в нижних долях обеих долей железы центральной зоны при хронической эндогенной интоксикации, обусловленной циррозом печени.

Ключевые слова: цирроз печени, хроническая эндогенная интоксикация, щитовидная железа, регенерация, тиреоидный фактор транскрипции (ТТФ-1), фактор транскрипции Pax8

FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF SPECIFIC MARKERS OF THYROCYTE PROLIFERATION DURING HEPATIC CIRRHOSIS

Polyakova L.V.¹, Kalashnikova S.A.¹, Gazaryan K.E.¹, Vaniev A.G.¹, Fogel A.V.¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia, Pyatigorsk, e-mail: ar.vaniew@yandex.ru

During chronic hepatic insufficiency caused by cirrhosis of the liver, chronic endogenous intoxication develops, which involves various organs in the pathological process, including the thyroid gland. Chronic damage of the thyroid gland leads to a change in adaptive capacity and may be accompanied by reorganization of the parenchyma due to the proliferation of thyrocytes. The aim of the study is to determine the patterns of distribution of specific markers of thyrocyte proliferation in hepatic cirrhosis. Autopsy material from 32 adult men (liver and thyroid tissue) was used for the study, followed by standard histological examination of various areas of the thyroid gland. An immunohistochemical study of the thyroid tissue was carried out using polyclonal antibodies of specific thyrocyte transcription factors: thyroid transcription factor (TTF-1) and the factor encoding the Pax8 genes (Pairedbox 8). According to the study, it was found that the largest number of immunopositive cells was located in the lower lobe of the thyroid gland, mainly in the extrafollicular epithelium. Analysis of the morphometric sings of cell proliferative activity revealed an increase in the area of the thyroid nuclei in the central and peripheral zones, as well as the predominance of immunopositive cells to TTF-1 and Pax8 in the central zone. Thus, the most active proliferative sites were found in the lower lobules of both thyroid lobes of the central zone during chronic endogenous intoxication caused by cirrhosis of the liver.

Keywords: liver cirrhosis, chronic endogenous intoxication, thyroid gland, regeneration, thyroid transcription factor (TTF-1), Pax8 transcription factor

В настоящее время для оценки пролиферативной активности клеток используется множество ядерных маркеров, которые нередко являются неспецифичными и свидетельствуют о вступлении клетки в фазу репликации. Наиболее известными являются

такие факторы клеточной пролиферации, как PCNA, Ki-67, PNH₃, последний из которых, по данным исследователей, дает наименьшее число ложноположительных результатов [1]. Однако оценить направленность пролиферативных процессов в результате физиологической регенерации или репарации в определенных тканях по-прежнему проблематично. Наиболее высокой пролиферативной активностью и способностью к полноценному восстановлению обладают эпителиальные ткани, где исключением не является железистый эпителий, в том числе и щитовидной железы (ЩЖ) [2].

Известно, что фолликулярный эпителий является высокочувствительным к различного рода негативным влияниям и реагирует изменением синтеза гормонов с развитием морфологических изменений в паренхиме ЩЖ, что приводит к нарушению тиреоидного гомеостаза [3]. Определить способность к восстановлению тироцитов при утрате клеток фолликулярного и экстрафолликулярного эпителия возможно, оценив распределение основных маркеров пролиферации тироцитов. Известно, что к таковым относят тиреоидспецифический фактор транскрипции (thyroidtranscriptionfactor-1 (TTF-1)), который находится в тесном взаимодействии с другим фактором транскрипции, относящимся к семейству генов Pax8 (Pairedbox 8), участвующим в перестройке щитовидной железы, путем дифференциации тироцитов по определенному фенотипу [4, 5]. Однако Pax8 может быть выявлен в эмбриональных тканях почек, нервной системы, что свидетельствует о его локализации в различных клетках, включая и зрелые тироциты [6]. Показано участие Pax8 совместно с TTF-1 в регуляции синтеза тироглобулина, тиропероксидазы и транспортера йода.

Таким образом, достоверно оценить пролиферативную активность тироцитов возможно при совместном определении Pax8 и TTF-1, в то время как направленность данного процесса и топография иммунопозитивных клеток к маркерам транскрипции остаются не ясными.

Цель исследования заключается в определении закономерности распределения специфических маркеров пролиферации тироцитов при циррозе.

Материал и методы исследования. В рамках стандартного гистологического исследования был использован аутопсийный материал (ткани ЩЖ и печени) от 32 лиц 40–45 лет мужского пола, где наличие цирроза печени верифицировалось при окраске гематоксилином и эозином, также при окраске по ван Гизону. Нами были отобраны только те случаи, в которых наблюдались ремоделирование печеночной паренхимы с образованием узлов регенерации, массивной пролиферации соединительной ткани, а также наличие участков жировой дистрофии гепатоцитов, так как в большинстве случаев лица среднего возраста имели алкогольную этиологию заболевания, где первичным было развитие

жирового гепатоза. Также наиболее распространенной причиной развития цирроза печени у лиц данной возрастной группы было наличие в анамнезе вирусного гепатита В или гепатита С. С целью исключения влияния половых гормонов и выявления гендерных различий нами были выбраны лица одного (мужского) пола. Таким образом, критериями включения в группу исследуемых лиц были: мужчины среднего возраста, наличие цирроза печени и печеночной недостаточности (по клиническим данным), отсутствие в анамнезе эндокринных заболеваний. Причиной смерти во всех случаях согласно медицинскому свидетельству о смерти было кровотечение из варикозно расширенных вен пищевода. Учитывая, что гистологическое исследование входит в стандарт патолого-анатомического исследования органов при аутопсии, нами был произведен скрининговый отбор случаев с наличием перестройки тиреоидной паренхимы различной степени выраженности, что составило 77,3% всех случаев. При окраске ткани ЩЖ гематоксилином и эозином наблюдалось наличие мелкоузловых образований, которые располагались преимущественно в нижней доле щитовидной железы и отграничивались тонкими прослойками соединительной ткани. Однако определить степень пролиферации тироцитов, их распределение в ткани ЩЖ, а также достоверно судить о наличии клеток, вступивших в фазу деления, при стандартном гистологическом исследовании не представляется возможным. В связи с этим нами было выполнено иммуногистохимическое исследование непрямым иммунопероксидазным методом с использованием поликлональных антител к Pax8 и TTF-1 с системой визуализации на основе диаминобензидина (DAB) (фирмы Spring Bioscience, США) согласно рекомендуемому протоколу фирмы-производителя. Затем производили микрофотосъемку с помощью микроскопа Leica DM 1000 и программного базового пакета «Leica Application Suite» (Leica, Германия). Анализ распределения маркеров пролиферации тироцитов проводился с учетом зональности щитовидной железы – центральная и периферическая зоны, а также с учетом верхней, средней и нижней частей каждой доли, где границей между ними служила условная линия, расположение которой связано с особенностями микроциркуляторного русла ЩЖ.

Морфометрическое исследование проводили с использованием инструментов программного обеспечения «Leica Application Suite», определяли площадь ядер иммунопозитивных клеток к TTF-1 (S_{TTF-1} , мкм^2), площадь ядер иммунопозитивных клеток к Pax8 (S_{Pax8} , мкм^2), площадь ядер иммунонегативных тироцитов в группе TTF-1 и Pax8 ($S_{negTTF-1}$ и $S_{negPax8}$, мкм^2), площадь тироцитов (S , мкм^2), ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦО), рассчитанное по формуле: $ЯЦО = S_{я}/S_{ц}$ (где $S_{я}$ – площадь ядра, $S_{ц}$ – площадь цитоплазмы), процент иммунопозитивных клеток в поле зрения для каждого случая. Кроме этого, для достоверного включения периферической и центральной зон

определяли диаметр фолликулов (D , мкм). Статистическая обработка результатов производилась в программе Statistica версии 13.0.

Результаты исследования и их обсуждение. В проведенных нами ранее исследованиях при окраске гематоксилином и эозином выявлены закономерности перестройки ткани ЩЖ на фоне хронической эндогенной интоксикации, обусловленной гепатофиброзом/циррозом [7].

При проведении иммуногистохимического исследования выявлены особенности распределения иммунопозитивных клеток к тиреоидным факторам транскрипции. Следует отметить, что при определении количества иммунопозитивных тироцитов к Pax8 клетки определялись как в интрафолликулярном, так и в экстрафолликулярном эпителии (рис. 1А, Б).

При этом позитивное окрашивание тироцитов наблюдалось в островках экстрафолликулярного эпителия, где в основном был представлен паренхиматозный компонент, а не за счет дочерних фолликулов согласно классическому пути образования фолликулов. Иммунопозитивные клетки к Pax8 распределялись неравномерно в зависимости от зональности ЩЖ. В периферической зоне, где фолликулы были крупнее и содержали значительное количество коллоида, наибольшее число иммунопозитивных клеток наблюдалось со стороны экстрафолликулярного эпителия, в то время как фолликулярный эпителий имел отдельные иммунопозитивные клетки, часть из которых давала ложнопозитивное окрашивание.

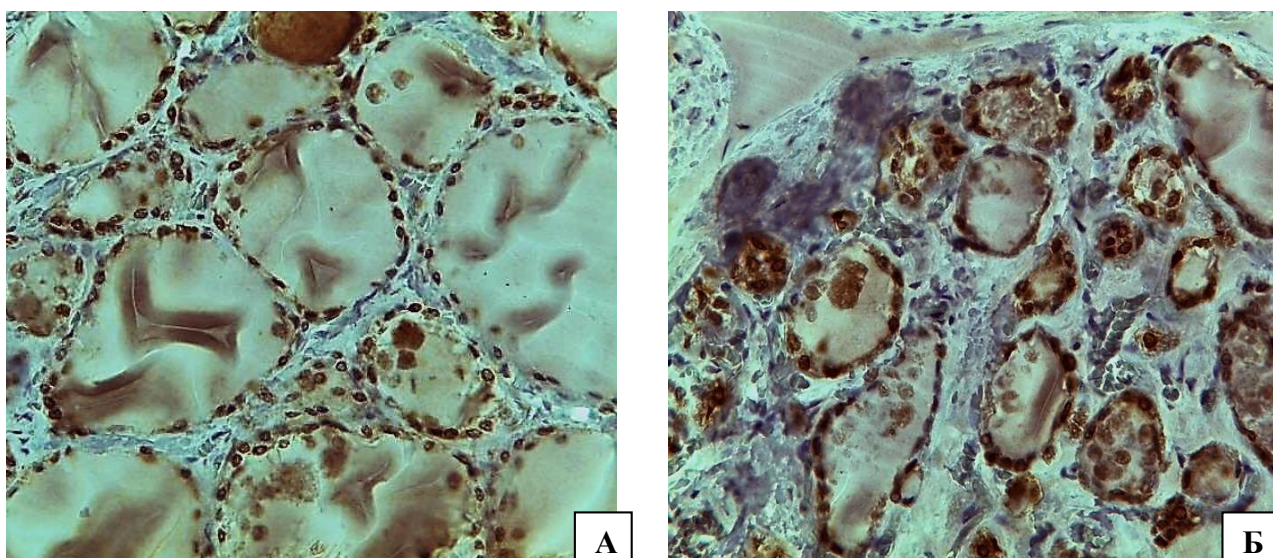


Рис. 1. Распределение иммунопозитивных клеток к Pax8 в периферической (А) и центральной (Б) зонах нижней доли щитовидной железы. Ув. 10, об. 20

Также при сопоставлении структуры интрафолликулярного эпителия и наличия

иммунопозитивных клеток к Рах8 было установлено, что эпителий имел уплощенную или кубическую форму, что косвенно свидетельствовало об эутиреоидном состоянии, а единичные клетки вступали в фазу деления. Наличие иммунопозитивных клеток к Рах8 интрафолликулярного эпителия можно объяснить способностью к физиологической и высокой репаративной регенерации всех эпителиальных тканей. При анализе строения центральной зоны ЩЖ было установлено, что диаметр фолликулов был меньше по сравнению с периферической зоной, эпителий имел кубическую форму, количество иммунопозитивных клеток было значительно больше по сравнению с периферической зоной.

В островках экстрафолликулярного эпителия практически все клетки имели иммунопозитивную реакцию к Рах8, что свидетельствовало о высокой пролиферативной активности тироцитов. В сформированных фолликулах интрафолликулярный эпителий также сохранял пролиферативную активность, при этом количество иммунопозитивных клеток к Рах8 напрямую зависело от диаметра фолликула (мелкие фолликулы имели большее количество иммунопозитивных клеток), что может служить источником формирования так называемых радиальных узелков центральной зоны и не противоречит данным литературы. Однако результаты иммуногистохимического исследования при использовании Рах8 нельзя оценить однозначно, так как Рах8 отводится роль в синтетической функции тироцитов, что может свидетельствовать об усилении транспорта йода за счет продукции тиропероксидазы и тироглобулина и, следовательно, давать иммунопозитивную реакцию.

В связи с этим дальнейшее исследование было направлено на изучение распределения иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 в ткани ЩЖ. Так, в периферической зоне отмечалось наличие иммунопозитивных клеток в интрафолликулярном эпителии, которые чередовались с клетками в стадии покоя, при этом их количество не зависело от диаметра фолликулов; в равной степени они были выявлены как в мелких, так и в крупных фолликулах. Со стороны экстрафолликулярного эпителия были выявлены единичные клетки к ТТФ-1 (рис. 2 А, Б).

При анализе центральной зоны определялось значительное количество иммунопозитивных клеток к ТТФ-1, которые располагались как диффузно, так и группами, образуя островки экстрафолликулярного эпителия. Кроме этого, пролиферация клеток наблюдалась со стороны фолликулярного эпителия, где отмечались образование подушечек Сандерсона и формирование дочерних фолликулов, что не противоречит полученным нами ранее данным [7].

При морфометрическом исследовании было установлено, что диаметр фолликулов периферической зоны ЩЖ был в 2,6 раз больше, чем центральной зоны, что связано с депонированием коллоида.

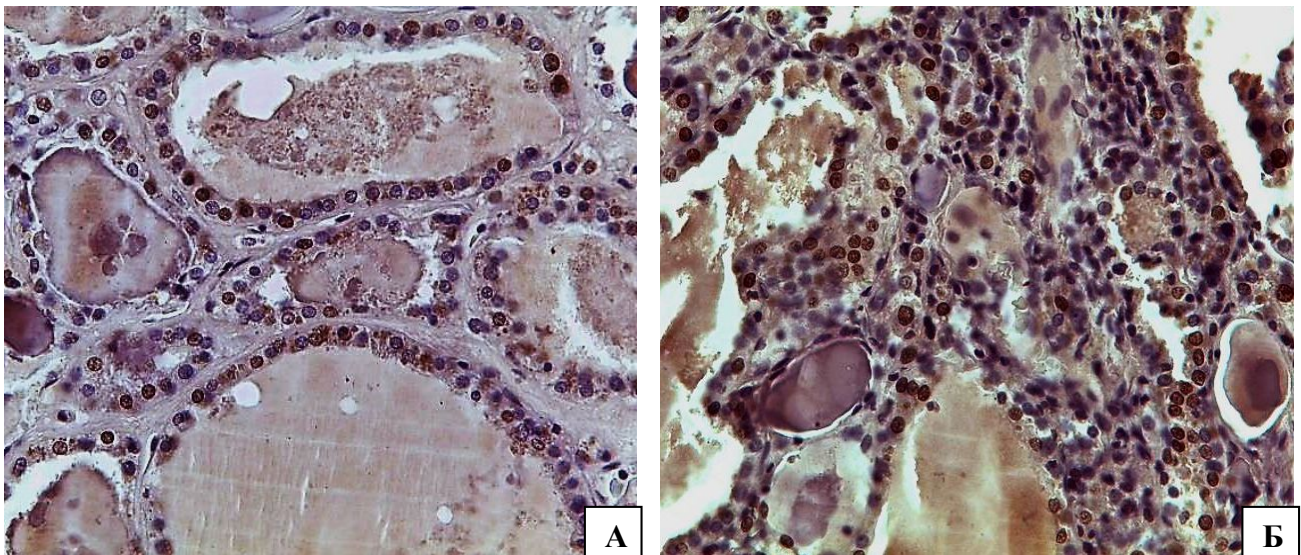


Рис. 2. Распределение иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 в периферической (А) и центральной (Б) зонах нижней доли щитовидной железы. Ув. 10, об. 20

Существенно отличались показатели пролиферации тироцитов в центральной и периферической зонах. Количество иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 в центральной зоне было в 1,4 раза больше, чем в периферической, что объясняется наличием мелких фолликулов и островков экстрафолликулярного эпителия, которые участвуют в фолликулогенезе ЩЖ. Количество иммунопозитивных клеток к Рах8 в периферической зоне не имело статистической значимости по сравнению с количеством иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 ($p > 0,05$), в то время как в центральной зоне процент иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 существенно превышал показатели таковых к Рах8 – в 1,7 раза ($p < 0,05$), таблица 1.

При сравнении морфометрических показателей площади ядер иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 и Рах8 достоверных отличий выявлено не было как в центральной, так и в периферической зонах ЩЖ. Сопоставление площади ядер иммунопозитивных и иммунонегативных клеток показало, что $S_{ТТФ-1}$ и $S_{Рах8}$ существенно отличались, площадь ядер иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 и Рах8 увеличивалась в 1,1 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). Площадь тироцитов зависела от функционального состояния и фазы клеточного цикла. Так, клетки в период покоя (G_0) имели меньшую площадь, чем клетки, вступившие в фазу деления. Данный факт подтверждался наличием иммунопозитивных клеток к специфическим факторам транскрипции, что, по-видимому, связано с усилением белково-синтетических процессов. При оценке ЯЦО иммунопозитивных клеток к ТТФ-1 и Рах8 достоверных отличий выявлено не было, что свидетельствует о достоверности полученных данных и эффективности использования данных маркеров для определения направленности пролиферативной активности тироцитов ($p < 0,05$).

Таблица 1

Морфометрические показатели тиреоидной паренхимы при хронической эндогенной интоксикации на фоне цирроза печени (M±m)

Морфометрические показатели	Зоны щитовидной железы	
	Центральная зона	Периферическая зона
Диаметр фолликулов, мкм	74,51±7,3	196,74±42,83*
Количество иммунопозитивных клеток ТТФ-1, %	31,1±0,9	27,27±0,7*
Количество иммунопозитивных клеток Рах8, %	18,36±0,3	26,09±0,8*
S _{ТТФ-1} , мкм ²	25,54±1,7	27,38±2,1
S _{Рах8} , мкм ²	27,97±2,27	27,79±6,3
S _{negТТФ-1}	22,45±1,3	21,84±2,6
S _{negРах8} , мкм ²	21,48±1,2	20,16±2,1
S _{тироцитовТТФ-1} , мкм ²	71,91±5,1	85,78±7,3*
S _{тироцитовРах8} , мкм ²	75,17±2,1	86,49±3,7*
ЯЦО _{тироцитовРах8}	0,55±0,1	0,50±0,1
ЯЦО _{тироцитовТТФ-1}	0,64±0,2	0,51±0,1

* статистически значимые показатели центральной и периферической зон (достоверность p≤0,05)

Заключение. Соматическая патология, сопровождающаяся синдромом хронической эндогенной интоксикации, приводит к развитию полиорганной недостаточности с вовлечением органов эндокринной системы, что выражается в их морфофункциональной перестройке. Так, компенсаторно-приспособительные процессы ткани ЩЖ к негативным воздействиям происходили за счет наиболее мобильного компонента в отношении репаративных возможностей – эпителиальной ткани (тироцитов). Однако регенерация тироцитов происходила неравномерно: наибольшему влиянию подвергались участки нижних долек ЩЖ, что проявлялось в увеличении числа иммунопозитивных клеток к специфическим тиреоидным факторам транскрипции (ТТФ-1 и Рах8). Учитывая разнонаправленность значимости данных маркеров, обосновано их сочетанное использование для выявления пролиферативных процессов в ЩЖ. Также с учетом зональности ЩЖ выявлены наиболее «активные» участки, которые располагались в центральной зоне каждой доли и могут служить источником образования новых фолликулов.

Список литературы

1. Bosch D.E., Kilgore M.R., Schmidt R.A., Swanson P.E., Rendi M.H., Chang O.H. Comparison of Proliferation Markers Ki67 and Phosphohistone-H3 (pHH3) in Breast Ductal Carcinoma In Situ. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2017. vol. 25. no.8. P. 543-547. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000555.
2. Lee J., Yi S., Chang J.Y., Kang Y.E., Kim H.J., Park K.C., Yang K.J., Sul H.J., Kim J.O., Yi H.S., Zhu X., Cheng S.Y., Shong M. Regeneration of thyroid follicles from primordial cells in a murine thyroidectomized model. *Lab. Invest.* 2017. vol. 97. no.4. P. 478-489. DOI: 10.1038/labinvest.2016.158.
3. Лубская Н.С., Никонорова М.А., Гранитов В.М., Матрос О.И. Варианты дисфункции щитовидной железы у пациентов с хроническим гепатитом С (на материале Алтайского края) // *Вестник Мордовского университета.* 2017. Т. 27. С. 304-314.
4. Cerqueira T.L.O., Ramos Y.R., Strappa G.B., Jesus M.S., Santos J.G., Sousa C., Carvalho G., Fernandes V., Boa-Sorte N., Amorim T., Silva T.M., Ladeia A.M.T., Acosta A.X., Ramos H.E. Mutationscreeninginthe genes PAX-8, NKX2-5, TSH-R, HES-1 incohortof 63 Brazilian children with thyroid dysgenesis. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2018. vol. 62. no. 4. P. 466-471. DOI: 10.20945/2359-3997000000065.
5. Gucer H., Mete O. Positivity for GATA3 and TTF-1 (SPT24), and Negativity for Monoclonal PAX8 Expand the Biomarker Profile of the Solid Cell Nests of the Thyroid Gland. *Endocr.Pathol.* 2018. vol. 29. no. 1. P. 49-58. DOI: 10.1007/s12022-017-9511-6.
6. Koumarianou P., Gómez-López G., Santisteban P. Pax8 controls thyroid follicular polarity through cadherin-16. *J. Cell. Sci.* 2017. vol. 130. no. 1. P. 219-231. DOI: 10.1242/jcs.184291.
7. Калашникова С.А., Полякова Л.В. Особенности развития приспособительных и компенсаторных процессов в щитовидной железе на фоне экспериментального гепатофиброза // *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2018. Т.7. № 1. С. 40-46.