

ТИРЕОЇДНА ФУНКЦІЯ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АВТОІМУННИМ ТИРЕОЇДИТОМ НА РАНЬОМУ ТЕРМІНІ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ БІОПРЕПАРАТУ КОРДОВОЇ КРОВІ*

Курилко Ю. С., Малова Н. Г., Сиротенко Л. А.

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків, Україна
ukurilko1@gmail.com*

Розробка найбільш ефективних та максимально безпечних методів лікування хворих на автоімунний тиреоїдит (АІТ) залишається актуальною медико-соціальною проблемою. У сучасному світі від АІТ потерпають приблизно 3–5% населення, при чому з віком кількість хворих, у яких діагностується явище лімфоїдної інфільтрації зростає до 16% [1, 2]. Захворюваність на АІТ за останні двадцять років в Україні зросла більш, ніж у 10 разів. Тому актуальність пошуку більш ефективних засобів для терапевтичної корекції цієї найбільш розповсюдженої патології щитоподібної залози (ЩЗ) не підлягає сумніву. Особливо це важливо у зв'язку з тим, що утворення специфічних антитіл у ЩЗ при АІТ викликає деструктивні зміни у тиреоцитах та призводить до зниження функціональної активності залози, кінцевим результатом якої є гіпотиреоз. Як АІТ і гіпотиреоз, так і їх побічні явища, що розвиваються на тлі

зниження активності тироксин-залежних метаболічних процесів, все частіше зустрічаються серед населення репродуктивного та працездатного віку, що призводить до значної кількості соціально-економічних проблем.

Слід відзначити, що причини, діагностика, механізми розвитку цієї патології та її лікування на сьогодні є вельми суперечливими [3–5]. Різні автори дотримуються різних точок зору, не існує надійних методів діагностики АІТ, а також його лікування. Медикаментозний метод із застосуванням гормональних імуномодуляторів-супресорів часто не дуже ефективний та має багато протипоказань.

Крім того, однією із значних проблем замісної гормональної терапії є недосягнення компенсації захворювання. При цьому тривале застосування гормональних препаратів може викликати побічні ефекти, які інколи є не менш важкими, ніж основ-

* Роботу виконано в рамках НДР ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» «Патогенетичне обґрунтування корекції автоімунного ураження щитоподібної залози на основі засобу регенеративної медицини в експерименті» (№ держреєстрації 0119U102447).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості.

Рукопис надійшов до редакції 29.07.2021.

не захворювання. Таким чином, виходячи з сучасного стану проблеми, розробка нових методів лікування автоімунного ураження ЩЗ є вкрай нагальним питанням.

Усе більшої актуальності в сучасній тиреоїдології набуває проблема нормалізації стану імунної системи та гальмування деструкції тиреоїдної паренхіми при АІТ засобами імунокорегуючої терапії. Для цього на сьогодні в ендокринології певною альтернативою замісної терапії (або в комплексі з нею) можуть розглядатися фетальні біопрепарати, використання яких інтенсивно розширюється [6-8]. На теперішній час значний досвід застосування нативних та кріоконсервованих препаратів ембріофетоплатентарного комплексу (ЕФПК) при різних захворюваннях, в тому числі — автоімунної природи, має Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАНУ). Ефективність кріоконсервованих біопрепаратів підтверджується результатами експериментальних та клінічних досліджень [9–10]. Передумови для дослідження можливості застосування при лікуванні АІТ створюють окремі біопрепарати кордової крові (КК), зокрема, «Кріоцелл-Кріокорд». Відомо, що кордова (пуповинна) кров та плазма містять велику кількість протизапальних, гормональних, імуномодулюючих дезагрегантних аген-

тів, а також різних активаторів регенерації і диференціювання та антипроліферативні цитокіни, які запобігають клітинній та системній гіперстимуляції тощо. Цей унікальний комплекс дозволяє широко використовувати препарати КК в медичній практиці, у них є великий потенціал в лікуванні широко поширених сьогодні автоімунних захворювань [11–14].

У ДУ «ІПЕП ім. В. Я. Данилевського НАМНУ» на різних видах тварин раніше були отримані експериментальні дані, які підтверджували високу ефективність кріоконсервованих препаратів ЕФПК для усунення морфофункціональних порушень ЩЗ, пов'язаних із її дисфункцією — плаценти, суспензії фетальних тканин і фетального тимусу людини при різних шляхах застосування та мезенхімальних стромальних клітин (МСК) [14–16]. Однак дані щодо комплексного підходу до лікування АІТ, а також супутніх метаболічних розладів за допомогою препаратів кордової крові в сучасній літературі відсутні.

Мета роботи. Вивчення впливу безклітинного біопрепарату кордової крові з імуномодулюючими властивостями «Кріоцелл-Кріокорд» на тиреоїдну функцію щурів із змодельованим АІТ на ранньому терміні дослідження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Вивчення ефективності впливу препарату кордової крові «Кріоцелл-Кріокорд» на тиреоїдну функцію було проведено на 30 статевозрілих самцях щурів популяції Вістар із АІТ масою тіла 130–150 г.

Експериментальний АІТ викликали шляхом імунізації антигеном ЩЗ людини, виділеної субопераційно, в комбінації з повним ад'ювантом Фрейнда. Імунізація щурів проводилась наступним чином: 0,05 мл антигена із розрахунку на 100 г маси тіла щура змішували з тотожним об'ємом повного ад'юванта Фрейнда. Суміш вводили внутрішньом'язово або підшкірно в основу хвоста. Паралельно експериментальним тваринам проводили внутрішньочеревинні ін'єкції — 0,1 мл антигену, розведеного в пропорції 1:5 фізрозчином. Імунізація

проводилася 1 раз на тиждень, для отримання стійкого АІТ такі маніпуляції проводили чотирьохкратно.

Після завершення імунізації щурам із змодельованим АІТ парентерально вводили безклітинний біопрепарат кордової крові з очікуваною імуномодулюючою активністю «Кріоцелл-Кріокорд» — усього 10 ін'єкцій через добу із розрахунку 100 мкл на кг маси тіла. Особливістю даного біопрепарату є багатий біологічно-активний склад, це — біологічно-активні речовини білкової та пептидної природи: альфа-фетопротеїн, гемопоетини, нейрогенні фактори, монокіни, інтерлейкіни, інтерферони, фактори росту, комплекс імуностимуляторів та імуномодуляторів, соматотропний гормон, естрогени, стероїдні гормони, мікроелемен-

**Тиреоїдний статус самців щурів із експериментальним АІТ
через 7 діб після закінчення імунізації, ($\bar{X} \pm S_x$), n = 5**

Показник	Інтактний контроль	АІТ	
	величина	величина	% від ІК
Відносна маса ЩЗ мг/100 г м.т.	6,42 ± 0,48	10,10 ± 0,83	+ 57
T ₃ заг., нмоль/л	3,37 ± 0,25	4,18 ± 0,32	+ 24
T ₃ віль., пмоль/л	4,12 ± 0,40	9,37 ± 0,88 ¹⁾	+ 227
T ₄ заг., нмоль/л	72,91 ± 5,31	107,50 ± 9,34 ¹⁾	+ 47
T ₄ віль., пмоль/л	9,85 ± 0,83	26,20 ± 2,07 ¹⁾	+ 265
АТ ТГ, Од/мл	18,50 ± 1,21	59,70 ± 4,20 ¹⁾	+ 322
T ₃ заг./T ₃ віль.	0,82 ± 0,08	0,48 ± 0,06 ¹⁾	- 56
T ₄ заг./T ₄ віль.	7,40 ± 0,69	2,97 ± 0,33 ¹⁾	- 60
T ₄ заг./T ₃ заг.	21,61 ± 0,19	25,70 ± 2,81	+ 19
T ₄ віль./T ₃ віль.	2,39 ± 0,20	3,85 ± 0,24 ¹⁾	+ 61

Примітка:

¹⁾ Значущість змін показників відносно інтактного контролю (ІК), (P < 0,05).

ти, вітаміни. Біопрепарат «Кріоцелл-Кріоркорд» (серія № 10) було придбано у ІПКіК НАНУ, згідно договору про спільне виконання НДР АМН 03.20.

Перший етап дослідження та виведення тварин із експерименту проводили через місяць після закінчення введення препарату. Процес відбору зразків крові у всіх експериментальних щурів був одночасним та аналогічним. Гормональні дослідження (визначення вмісту тиреоїдних гормонів та антитіл до тиреоглобуліну (АТ ТГ) проведено за допомогою стандартних комерційних тест-наборів для імуноферментного аналізу виробництва фірми «Хема» (Україна) із використанням мікропланшетного імуноферментного аналізатора «Stat Fax 3200» (Awareness Technology inc., USA).

Для знеживлення щурів використовували метод миттєвого перерізання хребта в основі черепа під легким ефірним наркозом. Дослідження проводилися відповід-

но до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2016), схвалених VI Національним конгресом з біоетики, що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Отриманий у ході експериментальних досліджень цифровий матеріал обробляли методами варіаційної статистики. Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою параметричних методів. Для порівняння показників, які характеризуються нормальним розподілом, застосовували непарний t критерій Стьюдента. Різниця вважалася вірогідною при p < 0,05. Дані статистично оброблені із застосуванням програмного забезпечення Microsoft® Excel 2000 та програми «Біостатистика» (Primer of Biostatistics, Version 4.03 by Stanton A. Glantz).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Із метою оцінки функціональної активності ЩЗ та верифікації розвитку АІТ у щурів було проведено вибіркоче тестування основних показників, що характеризують стан тиреоїдної системи. Ці результати розглядалися як вихідні дані (табл. 1).

Показано, що у щурів з індукованим АІТ (АІТ-контроль) через 1 тиж. після закінчення імунізації на тлі практично не зміненого показника рівня загального T₃ було відмічено значне, більш, ніж двократне зростання вмісту вільних форм обох

тиреїдних гормонів та загальної фракції T_4 , що може розглядати як гіпертрофічна стадія розвитку АІТ (див. табл. 1).

Слід відмітити, що приріст вільних форм гормонів у декілька разів перевершував ступінь зростання загальних фракцій (підвищення заг./віл. форм становило 24/227% — для T_3 і 47/265%, — для T_4). Така невідповідність може вказувати на те, що імунізація значною мірою може впливати і на процеси зв'язування тиреоїдних гормонів із транспортними білками, зменшуючи їх спорідненість до глобулінів та альбумінів циркулюючої крові. Звертало на себе увагу, що у цих тварин значно, більш, ніж у 3 рази, зростала кількість АТ ТГ (з $18,50 \pm 1,21$ Од/мл — в контрольній групі до $59,70 \pm 4,20$ Од/мл — у тварин групи АІТ-контролю). Відповідно до відмічених вище відхилень від контрольних значень показників рівня тиреоїдних гормонів та антитиреоїдних антитіл у щурів також значуще змінюються і коефіцієнти співвідношення різних форм гормонів. Отримані результати дозволили підтвердити факт розвитку у щурів після чотирьохкратної імунізації стану аутоімунного ураження ЩЗ, що свідчили про адекватність обраної моделі даної патології.

Необхідно зазначити, що визначення рівня АТ ТПО у сироватці крові щурів виявилось малоефективним, що вірогідніше за все було обумовлено низькою специфічною чутливістю використаних тест-систем до біологічного матеріалу тварин. Таким чином, більш інформативним було визначення АТ ТГ.

Через 5 тижнів після закінчення імунізації (1 міс. після закінчення введення «Кріоцелл-Кріокорд») в групі АІТ-контролю прояви гіпертиреозу не зменшувалися, концентрація вільних форм гормонів зберігалася практично на тому ж рівні, що і після закінчення моделювання цієї патології (див. табл. 1 та табл. 2). В той же час спостерігалось і зростання загальних форм як T_3 , так і T_4 на тлі високих показників рівня АТ ТГ у сироватці крові (див. табл. 2).

На фоні введення біопрепарату КК виявлялася тенденція до нормалізації проаналізованих показників у порівнянні з групою АІТ-контролю. Так, у самців з АІТ після введення КК вміст загальних форм T_3 та T_4 не мав значущих відмінностей від показників інтактного контролю, одночасно знижувався вміст у сироватці крові вільних фракцій цих гормонів, хоча він і був

Таблиця 2

Тиреоїдний статус самців щурів із експериментальним АІТ через 1 міс. після закінчення введення біопрепарату «Кріоцелл-Кріокорд», ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$), n = 5

Показник	Інтактний контроль	АІТ-контроль		АІТ + «Кріоцелл-Кріокорд»	
	величина	величина	% від ІК	величина	% від АІТ
Відносна маса ЩЗ $\times 10^6$	$7,30 \pm 0,64$	$9,71 \pm 0,83$	+ 33	$8,08 \pm 0,78$	- 17
T_3 заг., нмоль/л	$3,50 \pm 0,29$	$5,94 \pm 0,37^{1)}$	+ 69	$4,14 \pm 0,47^{2)}$	- 30
T_3 віл., пмоль/л	$3,92 \pm 0,41$	$9,17 \pm 0,82^{1)}$	+ 233	$7,53 \pm 0,84^{1)}$	- 18
T_4 заг., нмоль/л	$50,50 \pm 4,77$	$121,00 \pm 13,06^{1)}$	+ 242	$68,80 \pm 7,04^{2)}$	- 43
T_4 віл., пмоль/л	$11,51 \pm 0,88$	$29,70 \pm 3,00^{1)}$	+ 258	$23,40 \pm 2,17^{1)}$	- 22
АТ ТГ, Од/мл	$15,74 \pm 1,21$	$58,40 \pm 3,92^{1)}$	+ 371	$22,20 \pm 1,62^{1) 2)}$	- 62
T_3 заг./ T_3 віл.	$0,90 \pm 0,08$	$0,65 \pm 0,04^{1)}$	- 28	$0,55 \pm 0,60^{1)}$	- 15
T_4 заг./ T_4 віл.	$4,40 \pm 0,30$	$5,75 \pm 0,33^{1)}$	+ 30	$2,94 \pm 0,23^{1) 2)}$	- 49
T_4 заг./ T_3 заг.	$14,40 \pm 1,01$	$20,37 \pm 1,81^{1)}$	+ 41	$16,60 \pm 1,41$	- 19
T_4 віл./ T_3 віл.	$2,90 \pm 0,22$	$3,35 \pm 0,37$	+ 14	$3,10 \pm 0,23$	- 8

Примітка:

¹⁾ Значущість змін показників відносно інтактного контролю (ІК);

²⁾ Значущість змін показників відносно АІТ-контролю.

вище контрольних значень. Такий їх стабільний і тривалий високий рівень у циркулюючій крові, окрім активації тиреоїдогенезу, доцільно розглядати як порушення у ланці зв'язування тиреоїдних гормонів із транспортними білками.

Біопрепарат «Кріоцелл-Кріокорд» також позитивно впливав на титр АТ ТГ: хоча цей показник і зберігався значуще вищим від показника в групі інтактного контролю,

він зменшувався більш, ніж вдвічі і мав вірогідні відмінності від даних, отриманих в групі щурів з експериментальним АІТ ($P > 0,05$ при порівнянні з обома контролями).

Таким чином, отримані дані вказували на гальмування процесу автоімунної агресії у тварин під впливом біопрепарату КК вже на ранньому терміні його післядії.

ВИСНОВКИ

У щурів після імунізації антигеном щитоподібної залози людини в комплексі з повним ад'ювантом Фрейнда в тиреоїдній системі виявлено значущі відмінності від контролю. У тварин спостерігалось більш, ніж двократне зростання вільних фракцій обох тиреоїдних гормонів, що супроводжувалося підйомом титру антитіл до тиреоглобуліну. Отримані дані свідчили про розвиток у тварин дисфункційного стану щитоподібної залози (гіпертрофічної стадії) який є характерною ознакою раннього етапу перебігу автоімунного тиреоїдиту.

Через 5 тижнів експерименту у тварин з автоімунним ураженням щитоподібної залози зменшення проявів гіпертиреозу не спостерігалось, вільні форми тиреоїд-

них гормонів та показник антитіл до тиреоглобуліну залишалися високими практично в тій же мірі, що і після закінчення імунізації. Крім того, у тварин зростали і загальні фракції обох гормонів. Така картина була підтвердженням стабільності та адекватності обраної моделі автоімунного тиреоїдиту.

У тварин з експериментальним автоімунним тиреоїдитом під впливом біопрепарату «Кріоцелл-Кріокорд» вже на ранньому етапі досліджень спостерігалися зміни у бік гальмування проявів автоімунної агресії та відбувались процеси нормалізації функціональної активності щитоподібної залози, про це свідчило значуще зменшення рівня загальних форм тиреоїдних гормонів та антитіл до тиреоглобуліну.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, et al. *Autoimmun Rev* 2015;14(2): 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.016>.
- Tkachenko VI. *Mizhnar Endokrynol Zhurn* 2018;14(3): 279-284. available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mezh_2018_14_3_14.
- Dedov II, Mel'nichenko GA. *Jendokrinologija, Moskva*, 2016; 1112.
- Gardner D, Gardner D, Shobek D. *Bazisnaja i klinicheskaja jendokrinologija, Moskva*, 2016;1: 464 p.
- Feldkamp J. *Dtsch Med Wochenschr* 2009;134(49): 2504-2509. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1243053>.
- Farkas G, Dégi R, Vörös P. *Transplant Proc* 1995;27(6): 3145.
- Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. *J Cell Sci* 2006; 119(11): 2204-2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>.
- Caplan AI, Dennis JE. *J Cell Biochem* 2006;98(5): 1076-1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>.
- Gol'cev AN. *Visn NAN Ukraïny* 2015;5: 35-37.
- Kovalov GA, Ischenko IO, Tynnyka LN, et al. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017;27(1): 71-80.
- Scherbina MA, Potapova LV, Scherbina IN, Musatova IB. *Probl Cryobiol Cryomed* 2008;18(3): 364-365. available at: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/412>.
- Vvedenskiy BP, Kovalev GA, Dedukh NV, Sandomirskiy BP. *Probl Cryobiol Cryomed* 2016;26(4): 361-374. available at: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/1245>.
- Poljachenko JuV, Nikonenko OS, Saljutin GV, et al. *Klitynna Transplantacija* 2013;1(1): 40-43.
- Grishhenko VI. *Problemy Kriobiologii* 2008;18(3): 269-274.
- Chernjavskaia EA. *Pryrodnychi nauky: istorija, suchasnist', majbutnje, dosvid JeS: materialy mizhnar. nauk.-prakt. konf., Vloclavek, 27-28 veres 2019*: 147-150.
- Reznikov OG. *Endokrynologija* 2003;8(1): 142-145.

**ТИРЕОЇДНА ФУНКЦІЯ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ
АВТОІМУННИМ ТИРЕОЇДИТОМ НА РАНЬОМУ ТЕРМІНІ
ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ БІОПРЕПАРАТУ КОРДОВОЇ КРОВІ**

Курилко Ю. С., Малова Н. Г., Сиротенко Л. А.

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків, Україна
ukurilko1@gmail.com*

Розробка нових методів лікування автоімунного ураження щитоподібної залози є на сьогодні актуальною проблемою ендокринології. Метою дослідження було вивчення впливу безклітинного біопрепарату кордової крові з імуномодуючими властивостями «Кріоцелл-Кріокорд» на тиреоїдну функцію щурів із змодельованим АІТ на ранньому терміні дослідження.

Моделювання автоімунного тиреоїдиту проводили шляхом імунізації антигеном щитоподібної залози людини, виділеної субопераційно, в комбінації з повним ад'ювантом Фрейнда на 30 статевозрілих самцях щурів, масою тіла 130–150 г. Корекцію проводили біопрепаратом «Кріоцелл-Кріокорд» парентеральним введенням. Гормональні дослідження (визначення вмісту тиреоїдних гормонів та антитіл до тиреоглобуліну проводили за допомогою стандартних комерційних тест-наборів для імуноферментного аналізу виробництва фірми «Хема» (Україна) на ранніх термінах післядії (7 днів, 1 місяць). Статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням методів варіаційної статистики. Для порівняння показників, які характеризуються нормальним розподілом, застосовували непарний *t* критерій Стьюдента. Різниця вважалася вірогідною при $p < 0,05$.

Показано, що біопрепарат кордової крові «Кріоцелл-Кріокорд» проявляє позитивний вплив із індукованим автоімунним тиреоїдитом. Відмічено нормалізуючий вплив проведеної корекції на тиреоїдну функцію тварин на ранніх термінах дослідження. Доведено гальмування проявів автоімунної агресії та нормалізацію функціональної активності щитоподібної залози після введення біопрепарату «Кріоцелл-Кріокорд» у тварин із експериментальним автоімунним тиреоїдитом, що може бути основою для розробки нового підходу до лікування хворих.

Ключові слова: автоімунний тиреоїдит, щитоподібна залоза, «Кріоцелл-Кріокорд».

**THYROID FUNCTION OF RATS WITH EXPERIMENTAL
AUTOIMMUNE THYROIDITIS AT AN EARLY PERIOD
AFTER THE INJECTION OF BIOPREPARATIONS OF CORD BLOOD**

Yu. S. Kurylko, N. G. Malova, L. A. Sirotenko

*SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine»,
Kharkiv, Ukraine
ukurilko1@gmail.com*

The development of new methods for the treatment of autoimmune thyroid disease is an actual problem of endocrinology. The **aim** of research was studying of the cell-free effect biological product of cord blood with immunomodulatory properties «Cryocell-Cryocord» on rats' thyroid function with AIT simulated at an early period of the study.

Simulation of autoimmune thyroiditis was carried out by immunization with a suboperatively isolated human thyroid antigen in combination completing Freund's adjuvant on 30 adult male rats weighing 130–150 g. Correction was carried out by parenteral injection of the «Cryocell-Cryocord». Hormonal research (determination of the content of thyroid hormones and antibodies to thyroglobulin were affected by using standard test kits for enzyme-linked immunosorbent assay at early stages after exposure (7 days, 1 month). Statistical maintained of the results was carried out using the methods of variation statistics. It was used normal distribution to unpaired Student's test to compare indicators. The difference was considered significant at $p < 0.05$.

It has been shown the biological preparation of cord blood «Cryocell-Cryocord» has a positive effect with induced autoimmune thyroiditis. It has been noted the normalizing result of the effected correction on the thyroid function of animals in the early period of the studying. It has been proved after the introduction of the biological preparation «Cryocell-Cryocord» in animals with experimental autoimmune thyroiditis observed the inhibition of the manifestations of autoimmune aggression and the normalization of the functional activity of the thyroid gland. These investigations can be the foundation for the development of a new approach to the treatment of patients.

Key words: autoimmune thyroiditis, thyroid gland, «Cryocell-Cryocord».