

# ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИЗМЕНЕННОГО ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ АКТИВНОСТЬ И АНГИОГЕНЕЗ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ САМОК МЫШЕЙ ЛИНИИ СЗ Н-А

УДК 599.323.4: 616.441

© Р. И. Глушаков<sup>1</sup>, Е. В. Козырко<sup>2</sup>, Г. А. Раскин<sup>1</sup>, И. В. Карпова<sup>3</sup>, А. А. Лебедев<sup>4</sup>, В. В. Михеев<sup>2</sup>, Н. И. Тапильская<sup>1</sup>, С. Н. Прошин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет» МЗ РФ;

<sup>2</sup> ФГБВОУ ВПО «Военно-Медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ;

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. Акад. И. П. Павлова» МЗ РФ;

<sup>4</sup> НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН;

<sup>5</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург

## Ключевые слова

мыши СЗ Н-А; экспериментальный гипертиреоз; открытое поле; иммуногистохимические маркеры ангиогенеза.

## Резюме

Исследование выполнено на 33-х половозрелых девственных самках мышей инбредной линии СЗ Н-А. Животные были рандомизированы в следующем соотношении 3:2:2, соответствующим экспериментальным группам: первая — гипертиреодная ( $n_1=15$ ), вторая — гипотиреодная ( $n_2=10$ ) и третья — эутиреодная, или контрольная ( $n_3=8$ ). Результаты исследования индивидуального поведения на 18-й и 40-й неделе эксперимента в тесте «открытое поле» выявили, что количественные показатели практически всех компонентов исследовательской активности у гипертиреодных мышей выше, чем у остальных двух групп на протяжении эксперимента. Обнаружено постепенное снижение исследовательской деятельности в гипотиреодной группе на протяжении всего эксперимента, что наиболее выражено для норкового рефлекса. В отношении элементов поведения, на наш взгляд характеризующих эмоциональное напряжение, наблюдаемая картина была несколько иной. Показатели для гипотиреодных и эутиреодных мышей практически не различались на протяжении всего эксперимента, тогда как показатели эмоциональности у гипертиреодных мышей были выше относительно остальных двух групп также на протяжении всего эксперимента. Результаты иммуногистохимического исследования свидетельствуют, что уровень экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в неокортексе и области гиппокампа CA1 преобладает в группе гипертиреодных мышей и в наименьшей степени экспрессировался в неокортексе и гиппокампе гипотиреодных мышей (различия достоверны при  $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии глиального фибриллярного кислого белка также ниже в группе гипотиреодных животных ( $p < 0,05$ ). Напротив, уровень экспрессии альфа рецептора к фактору роста тромбоцитов значимо преобладает в исследуемых областях ЦНС у мышей с депривацией по тироксину ( $p < 0,05$ ). Получен-

ные нами данные подтверждают роль тиреоидных гормонов в регуляции клеточных взаимоотношений не только в развивающейся, но и уже сформированной ЦНС.

## ВВЕДЕНИЕ

Заболевания щитовидной железы (ЩЖ) занимают первое место среди всех болезней эндокринной системы, причем женщины болеют в 5–10 раз чаще мужчин (Павлов и др., 2006). По данным исследователей, в будущем следует ожидать роста заболеваемости и распространенности числа пациентов с заболеваниями ЩЖ (Балаболкин и др., 2007; Krassas et al., 2010). Среди заболеваний ЩЖ на первом месте по распространенности доминируют аутоиммунный тиреодит (АИТ) и диффузный токсический зоб (ДТЗ), которые сопровождаются изменением тиреоидного статуса.

Тиреоидные гормоны (ТГ) имеют широкий спектр воздействий на весь организм. Известно, что посредством реализации геномных и негеномных эффектов ТГ оказывают влияние на пластический и энергетический обмен, клеточную пролиферацию, миграцию и ангиогенез, а также психоэмоциональную сферу. Как при избытке, так и при дефиците гормонов ЩЖ отмечаются расстройства центральной и периферической нервной системы. В частности, гипопункция щитовидной железы у детей является самой распространенной причиной умственной отсталости и неврологических расстройств (Таранушенко и др., 1999), а пациенты психиатрического профиля, страдающие униполярной и биполярной депрессией, часто имеют нарушения гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы (Bauer and Whybrow, 2001; Jackson et al., 2006). Однако морфофункциональные механизмы данных нарушений изучены недостаточно.

Данная работа посвящена изучению особенностей экспрессии маркеров ангиогенеза и глиаль-

ного фибриллярного кислого белка (GFAP) в головном мозге мышей при экспериментально измененном тиреоидном статусе, а также влиянию на поведение лабораторных животных при длительно протекающем гипер- и гипотиреозе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 33 половозрелых девственных самках мышей инбредной линии СЗ Н-А (питомник РАМН «Рапполово», Ленинградская область, Рапполово). В начале исследования возраст лабораторных животных в среднем составлял 40 сут с несущественной вариабельностью по массе — 18–20 г. Эксперимент проводили в течение 44 недель с 1 октября 2011 года по 5 августа 2012 года. После получения из питомника до начала эксперимента животные проходили 18-суточный акклиматизационный период, на протяжении которого дважды в сутки оценивали поведение и общее состояние каждого животного. Перед началом исследования животные были распределены случайным образом по трем клеткам в соотношении 3:2:2, соответствующим экспериментальным группам: первая — гипертиреоидная ( $n_1=15$ ), вторая — гипотиреоидная ( $n_2=10$ ) и третья — эутиреоидная, или контрольная ( $n_3=8$ ). Клетки с животными были размещены в одной комнате. Температура воздуха в помещении составляла 19–22 °С, относительная влажность — 50–70%. Температуру и влажность воздуха регистрировали ежедневно. На протяжении эксперимента мыши содержались на стандартном пищевом рационе (приказ МЗ СССР № 1179 от 10 октября 1983 г. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник»).

Животные первой (основной, гипертиреоидной) и третьей (контрольной, эутиреоидной) группы получали чистую воду из автопоилок *ad libitum*.

На лабораторных животных первой группы (15 самок) воспроизведена модель экспериментального гипертиреоза посредством хронического внутрибрюшинного введения L-тироксина в дозе 200 мкг на 100 г веса. Препарат разводили физиологическим раствором и вводили на протяжении всего эксперимента через день, при этом объем каждой инъекции составлял около 0,4–0,6 мл в зависимости от веса животного. L-тироксин был предоставлен РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь, г. Минск) в количестве 1,0 г сухого вещества.

На лабораторных животных второй (гипотиреоидной) группы воспроизведена модель экспериментального пропилтиоурацилового гипотиреоза путем замены воды в автопоилке на 0,5%-й раствор пропилтиоурацила. Пропилтиоурацил был закуплен у компании «Merck» (Германия). По расчетным данным, каждое животное получало примерно 1,9–2,2 мг пропилтиоурацила на 100 г массы тела в сутки.

Для корректности эксперимента животным второй и третьей (контрольной) групп вводили около 0,4 мл 0,9%-го физиологического раствора 1 раз в течение двух сут. Учитывая гибель животных во время проведения эксперимента, количество животных в каждой группе сокращалось. На 18-й ( $n_1=15$ ,  $n_2=10$ ,  $n_3=8$ ), 26-й ( $n_1=14$ ,  $n_2=10$ ,  $n_3=8$ ), 34-й ( $n_1=12$ ,  $n_2=9$ ,  $n_3=8$ ) и 40-й ( $n_1=11$ ,  $n_2=8$ ,  $n_3=7$ ) неделе после начала фармакологического воздействия исследовали индивидуальное поведение мышей. В качестве модели использовали тест «открытое поле». Эта методика широко применяется для анализа исследовательской активности и уровня эмоциональной реактивности грызунов. Установка «открытое поле» представляла собой квадратную площадку размером 60×60 см с бортиками высотой 25 см, разделенную на 16 квадратов. По всей площади «открытого поля» равномерно располагались 9 отверстий (норок) диаметром 20 мм, предназначенных для выявления видоспецифического компонента исследовательской активности у грызунов (норковый рефлекс). Тестирование проводили в звукоизолированной комнате при дневном освещении. Продолжительность одного опыта составляла 3 мин.

На основании поведенческого атласа для грызунов был выбран ряд элементарных двигательных актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение животного в «открытом поле». В начале тестирования животное помещали в центр «открытого поля». В процессе визуального наблюдения регистрировали следующие показатели поведения: количество пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность, или локомоция), число подъемов на задние лапы, или вертикальная двигательная активность (стойка на задних лапах с опорой на стенку или без опоры), которая считается показателем исследовательской активности; количество актов «груминга» (чистка собственного тела: чесание, вылизывание и выкусывание); число заглядываний в отверстие (частота проявления норкового рефлекса).

По окончании эксперимента проводилась эвтаназия животных методом декапитации. Далее осуществлялось посмертное выделение головного мозга лабораторных животных, который после извлечения помещали на 3 сут в 10%-й формалин. Для гистологического анализа головной мозг заливали парафином. С каждого парафинового блока с помощью микротомы Leica SM 2000R (Sliding Microtome for Routine Applications) были получены срезы толщиной 4 микрона. Парафиновые срезы были расправлены в водяной бане Гистобат LEICA HI1210. После этого они были нанесены на стекла с поли-L-лизиновым покрытием фирмы Menzel и высушены при температуре 35–35 °С в течение одного часа. Затем срезы подвергались депарафинизации в растворе о-ксилола (2× по 2 мин), обезвожены в 96% спирте (2× по 5 мин) и в 70% спирте однократно в течение

■ Таблица 1. Разведение первых антител

Антитело	Клон	Рабочее разведение	Фирма-производитель
VEGF	Rabbit ploy	RTU	Abcam
GFAP	Rabbit poly	RTU	DAKO
PDGFR- $\alpha$	Rabbit poly	1:200	Abcam

10 минут. В дальнейшем стекла промывали в дистиллированной воде и подвергали демаскировке антигенов в цитратном буфере фирмы DAKO (Target Retrieval Solution pH 6.0, код S169984–2) на водяной бане при температуре 95 °C в течение 40 минут. После этого стекла остывали до комнатной температуры вместе с буфером, в котором проводилась демаскировка, затем их промывали в Трис-буфере в течение 10 минут. Далее «поле» для иммуногистохимического исследования маркировали карандашом (DakoCytomation Pen, код S200230–2), повторно помещали в Трис-буфер (TBS pH 7,4) на 10 минут, и подвергали обработке 3%-й перекисью водорода для подавления эндогенной пероксидазы в течение 20 минут. Затем срезы промывали в Трис-буфере.

Первые антитела разводили в буфере (Antibody Diluent with Background Reducing Components фирмы DakoCytomation, code S3022) для разведения антител с компонентом, препятствующим неспецифическому связыванию антител. Разведение, специфичность и производители первых антител указаны в таблице 1. Экспозиция первых антител составляла 1 час при постоянной температуре 30 °C, поддерживаемой при помощи нагревательной платы (Гистоплата) LEICA HI1220, затем стекла со срезами промывали в Трис-буфере в течение 10 минут.

Система визуализации представлена набором EnVision (Dako, Дания), в качестве хромогена использовали диаминобензидин. После реакции с диаминобензидином срезы промывали в дистиллированной воде и подвергали подкрашиванию с помощью гематоксилина Майера в течение 1–2 минут, затем оставляли в горячей воде на 15 минут. Дегидратировали в 96%-м спирте (2 $\times$  в течение 10 мин), осветляли при помощи карбол-ксилола в течение

5 минут и ксилола в течение 5 минут. Срезы заключали в среду Ultramount (BioOptica, Италия).

Частоту клеток, позитивных в иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами, выражали в процентах (%). Оценивали не менее 10 полей зрения (при увеличении  $\times 250$ ).

#### Статистика

В случае распределения, близкого к нормальному, достоверность различий определяли, используя параметрический критерий Стьюдента. В остальных случаях использовали непараметрический критерий Вилкоксона–Мана–Уитни).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### Открытое поле

Результаты исследования индивидуального поведения на 18-й и 40-й неделе эксперимента в тесте «открытое поле» представлены в табл. 2 и табл. 3 соответственно.

Все зарегистрированные элементы поведения сгруппированы нами в две категории, одна из которых характеризует исследовательскую активность мышей, а вторая — их эмоциональность. Сразу следует отметить, что груминг чаще всего относят к мотивационной категории «самообеспечение». Однако этот элемент поведения, часто появляющийся у животных в незнакомой стрессующей ситуации, иногда трактуют как «смещенную активность». В данном конкретном случае мы склонны считать груминг именно «смещенным», неадекватным ситуации элементом поведения, который наряду с уриной и дефекацией отражает повышенное эмоциональное напряжение животных.

Обращает на себя внимание тот факт, что количественные показатели практически всех компонентов исследовательской активности у гипертиреоидных мышей выше, чем у остальных двух групп на протяжении эксперимента (табл. 2). Данная закономерность наиболее выражена для локомоции (горизон-

■ Таблица 2. Количество проявлений различных элементов поведения в открытом поле за 3 минуты у самок мышей линии СЗ Н-А с различным тиреоидным статусом на 18-й неделе эксперимента

Показатель	Эутиреоидные животные ( $n_1=15$ )	Гипотиреоидные животные ( $n_2=10$ )	Гипертиреоидные животные ( $n_3=8$ )
Локомоция	47,3 $\pm$ 3,1	54,7 $\pm$ 2,4	63,3 $\pm$ 1,9 ““,**
Подъем на задние лапы	7,0 $\pm$ 1,3	17,3 $\pm$ 2,1**	20,4 $\pm$ 3,4***
Заглядывания в отверстия	3,1 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,5	6,6 $\pm$ 0,4*“,“
<b>Исследовательская активность</b>	<b>57,4</b>	<b>76,7</b>	<b>90,3</b>
Груминг	3,4 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,4*“,“
Уриная	0,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,3
Дефекация	1,7 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,5
<b>Эмоциональность</b>	<b>5,7</b>	<b>5,0</b>	<b>8,5</b>

\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,005$ . “ —  $p < 0,05$ , ““ —  $p < 0,01$  (см, объяснение в тексте)  
\* — отличия от эутиреоидных; “ — отличия от гипотиреоидных

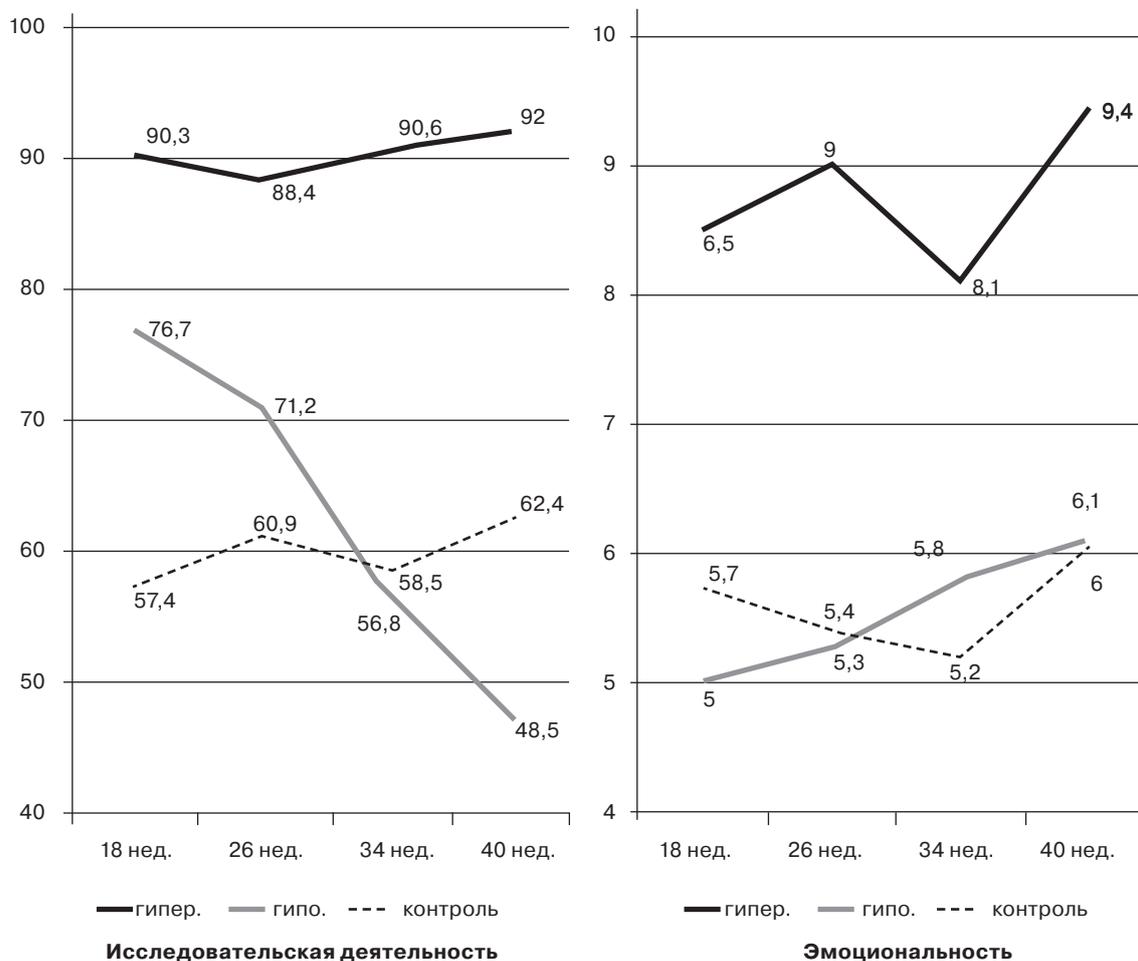
■ Таблица 3. Количество проявлений различных элементов поведения в открытом поле за 3 минуты у самок мышей линии СЗ Н-А с различным тиреоидным статусом на 40-й неделе эксперимента

Показатель	Эутиреоидные животные (n <sub>1</sub> =11)	Гипотиреоидные животные (n <sub>2</sub> =8)	Гипертиреоидные животные (n <sub>3</sub> =7)
Локомоция	48,1 ± 4,2	38,2 ± 3,2	65,9 ± 2,1 **,""
Подъем на задние лапы	9,2 ± 1,6	7,4 ± 2,3	19,3 ± 2,9 **,""
Заглядывания в отверстия	5,1 ± 1,4	1,3 ± 0,6	6,8 ± 0,8 "
<b>Исследовательская активность</b>	<b>62,4</b>	<b>46,9</b>	<b>92,0</b>
Груминг	3,4 ± 0,9	4,4 ± 0,6	5,4 ± 0,4 *
Уринация	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,4	2,2 ± 0,6*,""
Дефекация	1,7 ± 0,6	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4 "
<b>Эмоциональность</b>	<b>6,0</b>	<b>6,1</b>	<b>9,4</b>

\* — p < 0,05, \*\* — p < 0,01, \*\*\* — p < 0,005; " — p < 0,05, "" — p < 0,01 (см, объяснение в тексте); \* — отличия от эутиреоидных; " — отличия от гипотиреоидных мышей,

тальной исследовательской активности), в меньшей степени — для подъемов на задние лапы (вертикальная исследовательская активность) и в еще меньшей степени — для заглядываний в отверстия (норковый рефлекс) (табл. 3). Обращает на себя внимание постепенное снижение исследовательской деятельности в гипотиреоидной группе на протяжении всего эксперимента (рис. 1), что более всего выражено для норкового рефлекса (табл. 2 и 3).

В отношении элементов поведения, на наш взгляд характеризующих эмоциональное напряжение, наблюдаемая картина была несколько иной. Показатели для гипотиреоидных и эутиреоидных мышей практически не различались на протяжении всего эксперимента, тогда как показатели эмоциональности у гипертиреоидных мышей были выше относительно остальных двух групп также на протяжении всего эксперимента (табл. 2 и 3, рис. 1).



■ Рисунок 1. Динамика исследовательской активности и эмоциональности у мышей линии СЗ Н-А при различном тиреоидном статусе

■ **Таблица 4. Уровни экспрессии маркеров ангиогенеза и GFAP в головном мозге самок мышей линии СЗ Н-А с различным тиреоидным статусом на 40-й неделе эксперимента**

Маркеры	Эутиреоидные животные (n=7)		Гипотиреоидные животные (n=8)		Гипертиреоидные животные (n=11)	
	уровень экспрессии, %		уровень экспрессии, %		уровень экспрессии, %	
	неокортекс	гиппокамп СА1	неокортекс	гиппокамп СА1	неокортекс	гиппокамп СА1
VEGF	48,6±32,3	44,3±25,6	23,8±18,0	26,3±14,9	72,7±19,1 <sup>“</sup>	79,1±19,3 <sup>“</sup>
GFAP	20,9±11,6	32,3±18,9	9,3±4,9	10,7±6,2	30±16,6 <sup>“</sup>	38,8±15,4 <sup>“</sup>
PDGFR- $\alpha$	5,0±4,6	4,3±4,2	26,9±13,3 <sup>*</sup>	27,5±14,8 <sup>*</sup>	5,9±3,6 <sup>“</sup>	4,6±4,5 <sup>“</sup>

\* —  $p < 0,05$ , “ —  $p < 0,05$ ; \* — отличия от эутиреоидных; “ — отличия от гипотиреоидных мышей.

#### Экспрессия иммуногистохимических маркеров

Уровни экспрессии маркеров ангиогенеза, а также (глиального фибриллярного кислого белка) в неокортексе и зоне СА1 гиппокампа головного мозга мышей линии СЗ Н-А представлены в табл. 4.

Как следует из представленной таблицы уровень экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в неокортексе и области гиппокампа СА1 преобладает в группе гипертиреоидных мышей и в наименьшей степени экспрессировался в неокортексе и гиппокампе гипотиреоидных мышей (различия достоверны при  $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии глиального фибриллярного кислого белка также ниже в группе гипотиреоидных животных ( $p < 0,05$ ). Напротив, уровень экспрессии альфа рецептора к фактору роста тромбоцитов значимо преобладает в исследуемых областях ЦНС у мышей с депривацией по тироксину ( $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Йодотиронины имеют широкий спектр воздействия на нейральные клетки, однако именно глиальные клетки являются их главной мишенью. ТГ влияют на пролиферацию и дифференцировку как неизменных (Dezonne et al., 2009), так и злокачественно трансформированных клеток глии (Paul et al., 1996). Как известно, клетки нейроглии определяют гомеостаз нервной ткани, ее защиту от повреждений, предотвращая развитие патологических процессов. Гормоны ЩЖ влияют на экспрессию генов миелина (Jones et al., 2003), белка S100 $\beta$  (Dezonne et al., 2009), а также обуславливают взаимодействие глиальных клеток с белками внеклеточного матрикса (ВКМ), такими как ламинин и фибронектин (Trentin et al., 2003). Немаловажным является, что протеин S100  $\beta$ , действующий как нейротрофический фактор, содействует выживанию нейронов в условиях стресса и росту аксонов (Huttunen et al., 2000) и противодействует стимулирующему воздействию нейротоксинов на секрецию клетками микроглии TNF- $\alpha$  (Reali et al., 2005). На уровне всего организма ТГ оказывают системное селективное иммуномодулирующее воздействие, которое проявляется в системном ингибирующем действии на иммунную систему (подавляя хемотак-

сис, фагоцитоз, синтез цитокинов и активных форм кислорода в моноцитах, макрофагах, лейкоцитах, натуральных киллерах и лимфоцитах), с другой стороны, в неиммунных клетках йодотиронины активируют синтез тканеспецифичных провоспалительных генов и активируют неоангиогенез (De Vito et al., 2011).

Также уровень ТГ определяет характер поведения животных в новой обстановке. Так, крысы с исходно высоким уровнем тироксина проявляют повышенную активность в открытом поле. Наши исследования также показали, что гипертиреоидные мыши проявляют повышенную исследовательскую активность и эмоциональность по сравнению с эутиреоидными животными. Снижение исследовательской активности в группе индуцированного гипотиреоза, возможно коррелирует с полученными в опыте нейроморфологическими изменениями.

Однако, несмотря на универсальное нейротрофическое воздействие ТГ, различные отделы ЦНС по-разному реагируют на их воздействие. Так, в фундаментальных исследованиях Эдвина Гоулда с коллегами продемонстрировано, что только базальные отделы коры головного мозга и гиппокампа наиболее быстро отвечают на стимуляцию тиреоидными гормонами в виде повышения экспрессии GFAP и виментина (Gould et al., 1990). Поэтому в нашем исследовании для определения уровней экспрессии отмечены именно эти 2 анатомические области как наиболее чувствительные к стимуляции избыточных концентраций ТГ. По данным некоторых авторов, даже при непродолжительном, но выраженном гипертиреозе у крыс отмечается значительное увеличение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гиппокампе и коре головного мозга, однако только в гиппокампе отмечается достоверное увеличение экспрессии GFAP в растворимых и нитчатых фракциях. В поведении лабораторных животных в этом исследовании отмечалось ухудшение памяти. В нашем исследовании также получено достоверное снижение экспрессии GFAP в гипотиреоидной группе мышей линии СЗ Н-А, однако достоверного увеличения экспрессии данного белка в гипертиреоидной группе не получено. Возможно, это объясняется снижением чувствительности клеток-мишеней вследствие крайне длительного тиреотоксикоза. Схожие результаты получены при индукции экспери-

ментального гипотиреоза у крыс, где наряду со снижением экспрессии *GFAP* отмечалось снижение экспрессии глиальных переносчиков глутамата (*GLAST* и *GLT-1*) (Zamoner et al., 2008). Следует отметить, что мутация в гене *GFAP* является патогенетическим звеном болезни Александра, характеризующейся накоплением астроглией нерастворимых включений (волокон Розенталя) и клинически проявляющейся мышечной слабостью, гиперрефлексией, бульбарными и псевдобульбарными симптомами, а в детском возрасте выраженной задержкой психомоторного развития и интеллектуальными нарушениями (Alexander, 1949). В целом эти данные свидетельствуют о тиреоид-зависимой перестройке глиального цитоскелета (Nedzvetskyi and Nerush, 2010).

Гормоны ЩЖ и их аналоги демонстрируют выраженные проангиогенные свойства (Davis et al., 2009). Японские исследователи еще раз подтвердили предположение, что в головном мозге мышей процессы ангиогенеза в основном являются *VEGFR*- и *PDGFR*-зависимыми (Morita et al., 2013). В одном исследовании при модулировании церебральной ишемии у нокаутированных по гену *PDGFR-β* мышей отмечалось снижение процессов репарации и увеличение объема инфаркта (Shen et al., 2012).

В нашей работе при изучении влияния действия ТГ на ангиогенез в качестве маркеров использовались менее изученные непосредственно *VEGF*, секретируемый основной мишенью йодотиронинов — глиальными клетками, и *PDGFR-α* как менее специфичный рецептор для соответствующего семейства лигандов, тогда как в большинстве работ используется более специфичный *PDGFR-β*. Постулируя проканцерогенное действие избыточных концентраций гормонов ЩЖ, именно  $\alpha$ -изоформа *PDGFR* экспрессируется на злокачественно измененных астроцитах и является ранним прекурсором опухолевой трансформации нейральных клеток (Jackson et al., 2006).

В отношении проканцерогенных свойств йодотиронинов и их влияния на повышение экспрессии *PDGFR-α* в нашем исследовании получены противоположные данные. Это можно объяснить ролью вирусной инфекции, в частности, цитомегаловируса, в индукции опухолевой трансформации нейральных клеток (Lin et al., 1998), а ТГ способствуют увеличению *IFN-γ*-индуцированной *HLA-DR* экспрессии клетками моноцитарно-макрофагальной системы, отвечающих за представление (презентацию) антигенных детерминант иммунокомпетентным лимфоцитам (Nedzvetskyi and Nerush, 2010). Возможно, при гипотиреозе наблюдается снижение *IFN-γ*-индуцированной экспрессии *HLA-DR* иммунокомпетентными клетками, следствием чего является пониженная способность организма развивать специфический иммунный ответ. С другой стороны, повышение экспрессии *PDGFR-α* в гипотиреоидной группе является определенным механизмом компенсаторной реакции на длительно

протекающую гипоксию, связанную со снижением тиреоид-зависимых процессов ангиогенеза.

В целом наши данные подтверждают роль ТГ в регуляции клеточных взаимоотношений не только в развивающейся, но уже сформированной ЦНС.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремниевская В.М. Фундаментальная и клиническая тиреодология. — М.: Медицина. — 2007. — 816 с.
2. Павлов А.А., Алексеева Т.И., Стремоухов А.А. Наиболее распространенные заболевания щитовидной железы в общей врачебной практике // Вест. сем. мед. — 2006. — № 4. — С. 12–19.
3. Таранушенко Т.Е., Дагадин С.А., Панфилов А.Я., Манчук В.Т., Костюк А.К., Меньшова Т.Д. Оценка тяжести йодного дефицита в Красноярском крае // Проблемы эндокринологии. 1999. — № 2. — С. 19–24.
4. Alexander W.S. Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant // Brain (Oxford). — 1949. — Vol.72. — P.373–381.
5. Bauer M., Whybrow P.C. Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation // World J. Biol. Psychiatry — 2001. — Vol. 2, N. 2. — P. 59–69.
6. Davis P.J., Davis F.B., Mousa S.A. Thyroid hormone-induced angiogenesis // Curr. Cardiol. Rev. — 2009. — Vol. 5. — N.1. — P. 12–16.
7. De Vito P., Incerpi S., Pedersen J.Z. et al. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level // Thyroid. — 2011 — Vol. 21, N.8. — P. 879–890.
8. Dezonne R.S., Stipursky J., Gomes F.C. Effect of thyroid hormone depletion on cultured murine cerebral cortex astrocytes // Neurosci Lett. — 2009. — Vol.467, N.2. — P. 58–62
9. Gould E., Frankfurt M., Westlind-Danielsson A. et al. Developing forebrain astrocytes are sensitive to thyroid hormone // Glia. — 1990. — Vol.3. — N.4. — P. 283–292.
10. Huttunen H. J., Kuja-Panula J., Sorci G. et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 40096–40105.
11. Jackson E. L., Garcia-Verdugo J. M., Gil-Perotin S. et al. *PDGFR* alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased *PDGF* signaling // Neuron. — 2006. — Vol.51. — N.2. — P. 187–199.
12. Jones S.A., Jolson D.M., Cuta K.K. et al. Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes // Mol. Cell. Endocrinol. — 2003. — Vol.199, N 1/2. — P. 49–60.
13. Krassas G.E., Poppe K., Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health // Endocr. Rev. — 2010. — Vol.31, N.5. — P. 702–755.
14. Lin H. Y., Martino L. J., Wilcox B. D. et al. Potentiation by thyroid hormone of human *IFN-gamma*-induced *HLA-DR* expression // J. Immunol. — 1998. — Vol.161, N.2. — P. 843–849.
15. Morita S., Ukai S., Miyata S. *VEGF*-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mice // Eur. J. Neurosci. — 2013. — Vol. 37, N. 4.
16. Nedzvetskyi V.S., Nerush P.O. The effect of hyperthyroidism on the cognition processes and the state of the glial intermediate filaments in the rat brain // Fiziol. Zh. — 2010. — Vol.56, N.6. — P.100–107.
17. Paul S., Das S., Poddar R., Sarkar P.K. Role of thyroid hormone in the morphological differentiation and maturation of astrocytes: temporal correlation with synthesis and organization of actin // Eur. J. Neurosci. — 1996. — Vol. 8, N. 11. — P. 2361–2370.

18. Reali C., Scintu F., Pillai R., Donato R., Michetti F., Sogoso V. S100B counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia // *J. Neurosci. Res.* — 2005. — Vol. 81. — P. 677–686.
19. Shen J., Ishii Y., Xu G. et al. PDGFR- $\beta$  as a positive regulator of tissue repair in a mouse model of focal cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32, N. 2. — P. 353–367.
20. Trentin A.G., De Aguiar C.B., Garcez R.C., Alvarez-Silva M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion // *Glia.* — 2003. — Vol. 42 — P. 359–69.
21. Zamoner A., Heimfarth L., Pessoa-Pureur R. Congenital hypothyroidism is associated with intermediate filament misregulation, glutamate transporters down-regulation and MAPK activation in developing rat brain // *Neurotoxicology.* — 2008. — Vol. 29, N. 6. — P. 1092–1099.

### THE INFLUENCE OF EXPERIMENTALLY CHANGED THYROID STATUS ON COGNITIVE ACTIVITY AND ANGIOGENESIS IN BRAIN OF FEMALE OF INBRED MICE C3 H-A

*R. I. Glushakov, E. V. Kozyrko, G. A. Raskin, I. V. Karpova, A. A. Lebedev, V. V. Miheev, N. I. Tapil'skaya, S. N. Proshin*

◆ **Summary:** The study was performed using 33 virgin females of inbred mice C3H-A. The animals were randomized as follows 3:2:2. The first group was hyperthyroid ( $n_1=15$ ), the

second hypothyroid ( $n_2=10$ ) and the third euthyroid (control) ( $n_3=8$ ). The results of individual behavior investigation as to 18 and 40 weeks of our experiment in "open field" test clarified that quantitative traces of almost whole components of cognitive activity was much higher in hyperthyroid mice as compared to other groups (control and hypothyroid ones). The cognitive behavior activity has gradually been decreasing in hypothyroid group especially in connection to burrow reflex. As to those elements of behavior which are of characteristics of emotions the results were a bit different. The emotional characteristics were more expressed in hyperthyroid group as compared to control and hypothyroid ones. The immunohistochemical investigations clearly showed that expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neocortex and hippocampus prevails in hyperthyroid mice and less expressed in animals deprived of thyroid hormones ( $p < 0.05$ ). The level of glial fibrillar acidic protein (GFAP) expression was significantly lower in brain of hypothyroid animals ( $p < 0.05$ ). Otherwise the level of platelet derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGF-R $\alpha$ ) expression was much higher in brain of hypothyroid mice ( $p < 0.05$ ). Our results presented for this paper confirmed the key role of thyroid hormones in regulation of cell interaction not only for developing neural cells but also for adult central nerve system.

◆ **Key words:** inbred female mice C3 H-A; experimental hyperthyroid status; "open field"; immunohistochemical markers of angiogenesis.

#### ◆ Информация об авторах

*Глушаков Руслан Иванович* — врач онколог-гинеколог, кандидат медицинских наук. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет» Министерства здравоохранения РФ, Россия. 194100, Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, д. 16. E-mail: glushakovruslan@gmail.com

*Козырко Елена Васильевна* — студентка 6-го курса. Военно-Медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6.

*Раскин Геннадий Александрович* — врач-патологоанатом. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет» Министерства здравоохранения РФ, Россия. 194100, Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, д. 16.

*Карпова Инесса Владимировна* — кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии. ГБОУ ВПО «Государственный медицинский университет им. Акад. И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8. E-mail: inessa.karpova@gmail.com.

*Лебедев Андрей Андреевич* — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН. Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12.

*Михеев Владимир Владимирович* — доктор биологических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6.

*Тапильская Наталья Игоревна* — доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии с онкологией. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский педиатрический университет» Министерства здравоохранения РФ, Россия. 194100, Санкт-Петербург, ул. Кантемировская, д. 16.

*Прошин Сергей Николаевич* — доктор медицинских наук, доцент кафедры фармакологии. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Россия, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, 47/33. E-mail: psnjn@rambler.ru.

*Glushakov Ruslan Ivanovich* — Gynecologist, PhD, St.Petersburg State Medical Paediatric University, Ministry of Health, Russia, St.Petersburg, 194100, Kantemirovskaya street, 16. E-mail: glushakovruslan@gmail.com

*Kozyrko Elena Vasilievna* — Student, S. M. Kirov Military Medical Academy, St.Petersburg, 194044, Acad. Lebedev street, 6.

*Raskin Gennady Alexandrovich* — Dr. General Pathology, St.Petersburg State Medical Paediatric University, Ministry of Health, Russia, St.Petersburg, 194100, Kantemirovskaya street, 16.

*Karpova Inessa Vladimirovna* — PhD, Dozent, Dept. of Normal Physiology, The First St.Petersburg State Medical University, Ministry of Health, St.Petersburg 197022, Lev Tolstoy street, 6/8. E-mail: inessa.karpova@gmail.com.

*Lebedev Andrei Andreevich* — Dr. Biol. Sci., Professor, Leading research, Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine NWB RAMS, St.Petersburg 197376, Acad. Pavlov street, 12.

*Mikheev Vladimir Vladimirovich* — Dr. Biol. Sci., Lecturer, Dept. of Pharmacology, S. M. Kirov Military Medical Academy, St.Petersburg 194044, Acad. Lebedev street, 6.

*apil'skaya Natalia Igorevna* — Dr. Med. Sci., Professor, Dept. of Obstetrics and Gynecology, St.Petersburg State Medical Paediatric University, Ministry of Health, Russia, St.Petersburg, 194100, Kantemirovskaya street, 16.

*Proshin Sergei Nikolaevich* — Dr. Med. Sci., Dozent, Dept. of Pharmacology, Mechnikov North-West State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, St.Petersburg 195067, Piskarevsky prospect, 47/33. E-mail: psnjn@rambler.ru