

A positive result was obtained in the group of combined administration of cadmium chloride and selenium citrate relative to the indicator of the thickness of the flaps of the atrioventricular valves. In contrast to the group of isolated administration of cadmium chloride, in the group of cadmium chloride and selenium citrate, we observed a significant increase in the thickness of the latter.

In the group of combined administration of cadmium citrate and selenium citrates, the result was worse than in the group of isolated administration of cadmium citrate relatively to the thickness of the atrioventricular valves. This indicates an increase in the negative effect of cadmium citrate in combination with selenium citrate on the mentioned above morphometric parameter.

The selenium citrate requires further research, given the controversial results of the exposure with respect to cadmium compounds.

Key words: cardiotoxicity, cadmium, selenium, metal citrates, embryonic heart.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 07.05.2020 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-286-289

УДК 617-089:57.086.13]:616.441-008.61

^{1,2}Побеленский К. О., ²Побеленская Л. А., ¹Легач Е. И., ²Побеленский О. Н.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕЗЕКЦИИ И КРИОДЕСТРУКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (г. Харьков)

pobelensky@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Свойства криоконсервированных первичных культур клеток эндокринных желез неонатальных животных in vitro и in vivo при трансплантации», № государственной регистрации 0116U003494.

Вступление. Известно, что щитовидная железа (ЩЖ) относится к органам с медленным обновлением клеток [1]. В то же время способность к пролиферации в ответ на физиологическую или патологическую стимуляцию сохраняется у клеток ЩЖ в течение всей жизни. Резекция ЩЖ, вызывая гипотиреоз, является одним из активаторов гиперпластических процессов, направленных на поддержание продукции тиреоидных гормонов. При этом компенсаторная гиперплазия органа может приводить к нарушению его нормального гистологического строения [2].

Криохирurgia рассматривается в качестве альтернативного метода лечения доброкачественных узловых образований (ДУО) ЩЖ [3,4]. Преимущество данного подхода состоит в возможности проведения криодеструкции чрескожно под контролем эндоскопической техники, низкой себестоимости и малоинвазивности операции, снижении риска кровотечения, минимизации анестезии, сокращении времени операции и послеоперационного ухода [4,5]. В то же время для активного клинического использования криохирургического метода удаления ДУО ЩЖ накоплено недостаточно информации, особенно, что касается тяжести послеоперационного гипотиреоза и скорости регенерации тиреоидного остатка.

Цель исследования – сравнительное изучение результатов резекции и криодеструкции доли ЩЖ у крыс с моделью пропилтиоурацил-индуцированной диффузной гиперплазии.

Объект и методы исследования. Эксперименты проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Коми-

тета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПКК НАНУ), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В экспериментах использовали самок крыс линии SHR 6-месячного возраста. Животные содержались в виварии ИПКК НАНУ со свободным доступом к сбалансированному сухому корму («Гора», Украина). Для формирования диффузной гиперплазии ЩЖ по методу Polychronakos С. и соавт. [6] крысам давали 0,1%-й раствор ПТУ («Sigma», США) в питьевой воде в течение 90 дней.

Операции на животных проводили под общей анестезией с использованием 7,5 мг/кг массы тилетамин гидрохлорида, 7,5 мг/кг массы золазепам гидрохлорида (препарат «Золетил», «Virbac», Франция), 20 мг/кг массы ксилазина гидрохлорида (препарат «Седазин», «Biowet», Польша).

Осуществляли хирургический доступ, после чего крысам группы 1 проводили резекцию левой доли ЩЖ по методу Е.И. Легача и соавт. [7]. При этом перешеек оставляли интактным, а тиреоидный остаток составлял 1/5 левой доли. Крысам группы 2 проводили криодеструкцию с помощью медного криоапликатора с диаметром наконечника 1,5 мм и объемом охлаждаемой части 21,99 см³. Криоапликатор охлаждали до температуры -196°C путем прямого погружения в жидкий азот и выдерживания там до прекращения его кипения. Осуществляли криодеструкцию левой доли ЩЖ в течение 120 сек. После этого позволяли ткани самопроизвольно отогреться и повторяли криовоздействие в том же режиме.

После резекции или криодеструкции ЩЖ животным накладывали на рану послойно швы и возвращали в условия виварии. Введение 0,1% ПТУ прекращалось. Через 30, 60 и 120 дней животных выводили из эксперимента путем декапитации.

В экспериментах использовали животных следующих групп: 1 – резекция левой доли ЩЖ (n=14); 2 – криодеструкция левой доли ЩЖ (n=14); 3 – ложноперирированный контроль (n=12), которым производили все манипуляции, кроме резекции либо криодеструкции.

Определение уровня ТТГ, свободных Т₃ и Т₄ в сыворотке крови животных проводили методом ИФА с использованием тест-наборов ТТГ–ИФА–Бест, Т₄ свободный–ИФА–Бест («Вектор-Бест», Россия), св Т₃–ИФА («Хема», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для гистологических исследований ЩЖ фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, после чего их подвергали гистологической проводке, приготавливали гистологические срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Исследование гистологических срезов проводили с использованием светового микроскопа AmScore XYL-403 («AmScore», Китай) с цифровой камерой. Гистоморфологические показатели определяли в 20 полях зрения (ПЗ) гистологического образца, полученного от каждого животного. Измерения проводили с использованием программы AxioVision Rel. 4.8 («CarlZeiss», Германия). Подсчитывали: количество С-клеток в промилле на 1000 фолликулярных клеток; среднюю высоту фолликулярного эпителия (ВФЭ); среднее количество интерфолликулярных островков (ИФО); среднее количество фолликулов неправильной формы (ФНФ), к которым относили фолликулы со складками, фрагментацией, перетяжками. Все показатели нормировали на ПЗ размером 200x200 мкм².

Для статистического анализа данных использовали приложение Statistica 10 («StatSoft», США). Результаты представляли в виде Me (Q1; Q3) (Me – медиана, Q1 – 1-й квартиль; Q3 – 3-й квартиль). Статистическую значимость отличий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты исследований и их обсуждение. Согласно исследованиям предыдущих авторов к признакам регенеративных процессов в ЩЖ относятся: наличие клеточных митозов, увеличение ВФЭ, количества С-клеток, ИФО и ФНФ [2,8-10]. Данные признаки характерны для тиреоидного остатка после резекции ЩЖ, выполненной в достаточном объеме. В наших экспериментах был проанализирован ряд показателей, характеризующих репаративную регенерацию ткани ЩЖ и ее гормональный профиль у экспериментальных животных на разные сроки после операции (таблицы 1 и 2).

Анализ гистологических срезов ЩЖ показал значимое увеличение количества ИФО, из которых, как было показано ранее, возникают новые фолликулы [8], и ФНФ у животных 1-й и 2-й групп по сравнению с контрольными животными 3-й группы (таблица 1). Кроме того, значимое увеличение количества С-клеток на-

Таблица 1 – Морфологические показатели тиреоидного остатка левой доли у крыс экспериментальных групп и ЩЖ ложноперирированного контроля

Группа животных	ВФЭ, мкм	Количество С-клеток, %	Количество ИФО на ПЗ	Количество ФНФ на ПЗ	
Резекция (1-я группа)	30 сут	8,4 (7,9; 8,9)	106,3* (100,4; 117,2)	7,5*# (7,2; 8,1)	1,6* (1,2; 2,0)
	60 сут	8,0 (7,8; 8,1)	52,3 (44,6; 59,5)	6,8*# (6,2; 7,6)	1,5* (1,4; 1,6)
Крио-деструкция (2-я группа)	30 сут	8,0 (7,9; 8,1)	78,0 (61,3; 91,9)	5,0*# (4,4; 5,3)	1,9* (1,8; 2,1)
	60 сут	7,8 (7,6; 8,0)	70,7 (67,0; 76,1)	5,0*# (4,6; 5,3)	2,0* (1,8; 2,1)
Контроль (3-я группа)	7,2 (6,5; 7,7)	51,5 (48,1; 56,8)	1,9 (1,7; 2,1)	0,7 (0,3; 1,0)	

Примечание: * – показатель значимо различается по сравнению с 3-й группой (контроль), p<0,05; # – показатель значимо различается между 1-й и 2-й группами животных на соответствующие сутки наблюдения, p<0,05.

блюдалось у крыс с резекцией (1-я группа) на 30-е сутки после операции. У крыс с криодеструкцией (2-я группа) данный показатель также имел тенденцию к возрастанию. Значения средней ВФЭ в 1-й и 2-й группах значимо не отличались от контроля, хотя были повышены. Количество С-клеток (на 30-е сутки) и ИФО (на 30-е и 60-е сутки) у животных 1-й группы было выше, чем у животных 2-й группы.

Таким образом, как после резекции, так и после криодеструкции в тиреоидном остатке наблюдался комплекс гистоморфологических признаков, характерных для регенеративных процессов ЩЖ. При этом более активно они протекали у крыс с резекцией по сравнению с криодеструкцией ЩЖ.

Значимое увеличение уровня ТТГ было установлено у крыс обеих экспериментальных групп через 30 суток после операции (таблица 2). При этом наблюдалась тенденция к уменьшению уровня свободного Т₄ по сравнению с контролем. На 60-е и 120-е сутки эти различия нивелировались.

Уровень свободного Т₃ не отличался у крыс разных групп на всех исследованных сроках. Эти данные согласуются с полученными ранее Clark O.H. и соавт., которые уже на 14 сутки после резекции ЩЖ не установили значительной разницы данного показателя по сравнению с контролем [9].

Известно, что цитовидная железа относится к числу органов, которые реагируют гипертрофией и гиперплазией клеток в ответ на частичную тире-

Таблица 2 – Показатели ТТГ, свободных Т₃ и Т₄ у крыс разных групп

Группа животных	ТТГ, мМЕ/л	Т ₄ св, пмоль/л	Т ₃ св, пмоль/л	
Резекция (1-я группа)	30 сут	0,60* (0,10; 1,87)	11,10 (8,95; 13,95)	4,75 (4,50; 4,97)
	60 сут	0,03 (0,03; 0,10)	18,00 (16,72; 18,72)	4,60 (4,50; 4,75)
	120 сут	0,10 (0,08; 0,12)	18,80 (17,30; 20,40)	4,60 (4,40; 4,80)
Крио-деструкция (2-я группа)	30 сут	0,60* (0,45; 2,47)	11,60 (9,97; 13,92)	4,80 (4,50; 5,12)
	60 сут	0,17 (0,04; 0,35)	18,75 (17,80; 19,20)	4,70 (4,50; 4,95)
	120 сут	0,25 (0,17; 0,35)	17,65 (13,85; 21,80)	4,50 (4,42; 4,52)
Контроль (3-я группа)	0,10 (0,07; 0,25)	17,30 (13,40; 20,70)	4,60 (4,50; 4,80)	

Примечание: * – показатель значимо различается по сравнению с 3-й группой (контроль), p<0,05.

оидэктомии [9-12]. Объем удаленной ткани ЩЖ должен быть достаточен для того, чтобы активизировались процессы пролиферации клеток и образования новых фолликулов. В работе Ozaki T. и соавт. [10] было показано, что после резекции 1 и 2/5 доли ЩЖ у мышей количество микрофолликулов через две недели заметно увеличилось как в центральной части тиреоидного остатка, так и на краю резекции. Авторы пришли к выводу, что центральная часть оставшейся ткани ЩЖ служит центром пролиферации, которая позже распространяется и на периферию. При этом уровень T_4 приближался к контрольным значениям уже через 14 дней после операции.

При гемитиреоидэктомии у крыс в оставшейся доле ЩЖ в течение 2 месяцев наблюдается увеличение ВФЭ, количества ФНФ и митозов [9]. В исследованиях Okamoto M. и соавт. после частичной тиреоидэктомии у мышей было обнаружено большее количество ФНФ, а в составе тиреоидного эпителия резко увеличивалось количество реснитчатых клеток [11].

Механизм фолликулогенеза ЩЖ, изученный Toda S. и соавт. [13], может реализоваться несколькими разными путями. Образование новых фолликулов возможно из материнского фолликула посредством отпочковывания или деления его просвета. Другой способ состоит в появлении плотных ИФО, в которых позднее в результате апоптоза центрально расположенных клеток образуются полости, заполненные коллоидом.

Присутствие стволовых клеток в ЩЖ, за счет которых осуществляется ее репаративная регенерация, впервые было установлено Dumont J.E. и соавт. [1], после чего данный факт нашел свое подтверждение в более поздних исследованиях [14-16]. Происхождение стволовых клеток ЩЖ до конца не выяснено, хотя предполагается, что они могут являться резидентной субпопуляцией незрелых тироцитов и/или

быть производными мезенхимальных стромальных клеток [12].

Проведенный нами гистологический анализ свидетельствует, что процессы регенерации в ткани ЩЖ наблюдаются как после резекции, так и после криодеструкции, выполненной в режиме двойного криовоздействия в течение 120 секунд. В результате этого уровни тиреоидных гормонов в крови восстанавливаются после 1 месяца.

На основе сравнительной оценки гистоморфологических показателей можно заключить, что пролиферативные процессы менее активно протекают в ЩЖ после криодеструкции, чем после резекции. Эти данные согласуются с результатами, полученными Македонской В.А. и соавт., когда интраоперационное криовоздействие при хирургическом лечении диффузного токсического зоба замедляло регенерацию культуры ЩЖ [17].

Выводы. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что как после резекции, так и после криодеструкции в ткани ЩЖ наблюдаются процессы репаративной регенерации, о чем свидетельствуют увеличение высоты фолликулярного эпителия, повышение количества С-клеток, интрафолликулярных островков и аномальных фолликулов. При этом процессы фолликулогенеза после криодеструкции протекают менее активно, чем после резекции.

Перспективы дальнейших исследований. Криодеструкция является экспериментальным способом удаления доброкачественных узловых образований ЩЖ. Для дальнейшего внедрения ее в клиническую практику необходимы исследования, направленные на сравнительную оценку результатов лечения, получаемых с помощью данного способа и других современных, широко применяемых подходов, таких как лазерная, радиочастотная и микроволновая деструкция.

Литература

1. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev.* 1992 Jul;72(3):667-97.
2. Fedorov SV, Nigmatullin RT, Nartailakov MA, Kashaev MS. Stimulyaciya regeneracii ostatochnoj tkani shhitovidnoj zhelezy v eksperimente. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2006;1:72-5. [in Russian].
3. Khaziev VV, Tyazhelova OV, Makedons'ka VO. Sonografichni zmini strukturi ta ob'yemu shhitopodibnoyi zalozi pislya lokal'nogo intraoperacijnogo kriovplivu u khvorikh na vuzlovij eutireoidnij zob. *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny.* 2013;23(3):240-6. [in Ukrainian].
4. Hamed MS, Mansour SZ, Halawa MR, Bahaaeldin AM, Ibrahim NA, Ghoneim AG. Cryoablation of goiter irrespective of thyroid profile. *Thyroid Res Pract.* 2019;16(1):6-11.
5. Chizh NA. Endoskopicheskaya kriokirurgiya. *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny.* 2017;27(1):3-18. [in Russian].
6. Polychronakos C, Guyda HJ, Patel B, Posner BI. Increase in the number of type II insulin-like growth factor receptors during propylthiouracil-induced hyperplasia in the rat thyroid. *Endocrinology.* 1986;119(3):1204-9.
7. Legach EI. Retrogradnyj sposob tireoidektomii krysa kak adekvatnaya model' gipotireoza. *Transplantologiya.* 2005;8(2):92-4. [in Russian].
8. Kubarko AI, Yamashita S. Shhitovidnaya zheleza. *Fundamental'nye aspekty.* Minsk-Nagasaki; 1998. s. 368. [in Russian].
9. Clark OH, Lambert WR, Cavalieri RR, Rapoport B, Hammond ME, Ingbar SH. Compensatory thyroid hypertrophy after hemithyroidectomy in rats. *Endocrinology.* 1976 Oct;99(4):988-95.
10. Ozaki T, Matsubara T, Seo D, Okamoto M, Nagashima K, Sasaki Y, et al. Thyroid regeneration: characterization of clear cells after partial thyroidectomy. *Endocrinology.* 2012 May;153(5):2514-25.
11. Okamoto M, Hayase S, Miyakoshi M, Murata T, Kimura S. Stem cell antigen 1-positive mesenchymal cells are the origin of follicular cells during thyroid regeneration. *PLoS One.* 2013 Nov 21;8(11):e80801.
12. Kimura S. Thyroid regeneration: how stem cells play a role? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Apr 14;5:55.
13. Toda S, Aoki S, Suzuki K, Koike E, Ootani A, Watanabe K, et al. Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. *Cell Tissue Res.* 2003;312:281-9.
14. Hoshi N, Kusakabe T, Taylor BJ, Kimura S. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology.* 2007;148(9):4251-8.
15. Lan L, Cui D, Nowka K, Derwahl M. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3681-8.
16. Fierabracci A, Puglisi MA, Giuliani L, Mattarocci S, Gallinella-Muzi M. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J Endocrinol.* 2008;198(3):471-87.
17. Makedonskaya VA, Khaziev VV, Tyazhelova OV. Vliyanie dozirovannogo kriovozdejstviya na reпаратivnyj proccess v shhitovidnoj zheleze posle khirurgicheskogo lecheniya diffuznogo toksicheskogo zoba (po dannym ul'trazvukovogo issledovaniya). *Problemy kriobiologii.* 2006;16(1):88-93. [in Russian].

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ НАСЛІДКІВ РЕЗЕКЦІЇ І КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Побеленський К. О., Побеленська Л. А., Легач Є. І., Побеленський О. Н.

Резюме. У роботі представлена оцінка гістоморфологічних і біохімічних ознак репаративної регенерації тиреоїдного залишку після експериментальної резекції і криодеструкції щитоподібної залози (ЩЗ) у щурів. Результати дослідження дозволяють зробити висновок про те, що процеси фолікулогенезу у тканині ЩЗ спостерігаються протягом 60 діб після обох видів хірургічного втручання. Про це свідчать збільшення висоти фолікулярного епітелію, підвищення кількості С-клітин, інтрафолікулярних острівців і аномальних фолікулів. Нормалізація рівнів ТТГ та T_4 відбувається до 60-ї доби. Порівняльний аналіз виявив, що проліферативні процеси менш активно протікають в тканині ЩЗ після криодеструкції, ніж після резекції.

Ключові слова: щитоподібна залоза, криодеструкція, резекція, регенерація, тиреоїдні гормони.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕЗЕКЦИИ И КРИОДЕСТРУКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Побеленский К. О., Побеленская Л. А., Легач Е. И., Побеленский О. Н.

Резюме. В работе представлена оценка гистоморфологических и биохимических признаков репаративной регенерации тиреоидного остатка после экспериментальной резекции и криодеструкции щитовидной железы (ЩЖ) у крыс. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что процессы фолликулогенеза в ткани ЩЖ наблюдаются в течение 60 суток после обоих видов хирургического вмешательства. Об этом свидетельствуют увеличение высоты фолликулярного эпителия, повышение количества С-клеток, интрафолликулярных островков и аномальных фолликулов. Нормализация уровней ТТГ и T_4 происходит к 60-м суткам. Сравнительный анализ выявил, что пролиферативные процессы менее активно протекают в ткани ЩЖ после криодеструкции, чем после резекции.

Ключевые слова: щитовидная железа, криодеструкция, резекция, регенерация, тиреоидные гормоны.

COMPARATIVE STUDY OF THE THYROID GLAND RESECTION AND CRYODESTRUCTION OUTCOMES IN THE EXPERIMENT

Pobielienskyi K. O., Pobelenskaya L. A., Legach E. I., Pobielienskyi O. N.

Abstract. *Goal.* The goal was a comparative study of the results of resection and cryodestruction of the thyroid lobe in rats with a model of propylthiouracil-induced diffuse hyperplasia.

Methods. The experiments were performed on female SHR rats of 6 months of age. Diffuse hyperplasia was induced for 90 days using 0.1% PTU added to drinking water. Rats were divided on 3 groups: 1) rats with resection of the left thyroid lobe (the isthmus was left intact, and the thyroid residue was 1/5); 2) rats with cryodestruction of the left thyroid lobe; 3) sham-operated rats, which were used for all manipulations, except for resection or cryodestruction. Cryodestruction was performed two times during 120 s using a copper cryoprobe with a tip diameter of 1.5 mm and a volume of the cooled part of 21.99 cm³. After operations, the animals were returned to the vivarium conditions. The introduction of 0.1% PTU was canceled. On 30th, 60th and 120th days after operations the rats were killed; blood was taken to determine TSH, T_4 and T_3 ; samples of the thyroid gland were taken to prepare histological slides. The following histological indices were microscopically studied per high power field 200x200 μm²: the number of C-cells; the average follicular epithelium height (FEH); the average number of interfollicular islets (IFI); the average number of follicles of irregular shape (FIS) including follicles with folds, fragmentation, bands.

Results. The processes of folliculogenesis in thyroid tissue were observed within 60 days after both types of surgical intervention. A significant increase in the number of IFI and FIS was established in the 1st and 2nd groups of animals in comparison with sham-operated control. In addition, a significant increase in the number of C-cells was observed in rats of 1st group on the 30th day after surgery. In rats of 2nd group, this indicator also tended to increase. The values of FEH in the experimental groups did not significantly differ from the control. The number of C-cells and IFI was higher after resection than after cryodestruction. A significant increase in TSH levels was found in rats of 1st and 2nd groups for 30 days. At the same time, there was a tendency to a decrease in the levels of free T_4 in comparison with the control. The differences in hormone levels disappeared on the 60th day after surgery.

Conclusions. The evidence of thyroid tissue regeneration was established both in the case of resection and cryodestruction. A comparative analysis revealed that proliferative processes are less active after cryodestruction than after resection.

Key words: thyroid gland, cryodestruction, resection, regeneration, thyroid hormones.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 28.04.2020 року*