

УДК 591.444: 612.085.4: 616-092.4

Торба А.В., Фомина К.А., Беров В.И.

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ

Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки, г. Луганск

При изучении морфогенеза щитовидной железы необходимо соблюдать систематизированный порядок действий для решения научной задачи экспериментальной морфологии и достижения цели исследования. Комплекс специальных морфологических методов (органометрический, световой микроскопии, гистоморфометрии, электронной микроскопии), лабораторные, математические и статистические методы позволяют изучить морфогенез щитовидной железы на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях структурной организации, установить взаимосвязь между параметрами и оценить степень влияния факторов в зависимости от возраста и сроков наблюдения.

Ключевые слова: щитовидная железа, морфогенез, методология, эксперимент

Torba A.V., Fomina K.A., Berov V.I.

METHODOLOGY OF THYROID GLAND MORPHOGENESIS RESEARCH IN EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

Saint Luka Lugansk State Medical University, Lugansk

When studying the morphogenesis of the thyroid gland, it is necessary to follow a systematic procedure for solving the scientific problem of experimental morphology and achieving the research goal. A set of special morphological methods (organometric, light microscopy, histomorphometry, electron microscopy), laboratory, mathematical and statistical methods make it possible to study the morphogenesis of the thyroid gland at the organ, tissue, cellular and subcellular levels of structural organization, establish the relationship between the parameters and assess the degree of influence of factors depending on age and duration of observation.

Key words: thyroid gland, morphogenesis, methodology, experiment

Основоположником Луганской морфологической школы является профессор Владимир Георгиевич Ковешников (07.11.1931 - 17.05.2015) – человек, объединяющий в себе широту души с высокими организаторскими способностями, сдобреными искрой таланта, недюжинного ума и беззаветной преданности к любимому делу. Под его руководством выполнен крупный цикл фундаментальных научных исследований по изучению факторов среды обитания человека на различные органы и системы организма, разработаны пути коррекции и профилактики неблагоприятных последствий этих воздействий [1, 4, 8]. При этом эндокринная система является одной из наиболее чувствительных в организме, а непосредственно щитовидная железа принимает активное участие в регуляции и координации деятельности его органов и систем. В ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России изучением щитовидной железы на разных этапах постнатального онтогенеза в условиях воздействия на организм различных экзогенных и эндогенных факторов разной этиологии и интенсивности занимаются более 25 лет [2, 3].

Методология по своей сути – это теоретический фундамент, который определяет логику проводимого исследования, обосновывает выбранные методы и методики, адекватные предмету исследования, объединяет способы анализа полученных данных для представления

и интерпретации результатов эксперимента. Для изучения морфогенеза щитовидной железы на всех уровнях ее структурной организации необходимо соблюдать систематизированный порядок действий для решения научной задачи экспериментальной морфологии и достижения цели исследования. Принцип системности является фундаментом для структурно-логической последовательности исследования и составляет методологическую основу работы исследователя. Последовательность действий при изучении морфогенеза щитовидной железы заключается в аналитико-статистической обработке литературных данных по теме исследования, постановке эксперимента, использовании методов научного познания. Могут быть применены общие эмпирические методы (наблюдение, описание, измерение, сравнение), комплекс специальных морфологических методов (органометрия, световая микроскопия, гистоморфометрия, электронная микроскопия), лабораторные, математические и статистические методы. Все это позволит изучить морфогенез щитовидной железы на разных уровнях ее структурной организации.

Цель работы

Систематизировать порядок действий в изучении морфогенеза щитовидной железы на всех уровнях ее структурной организации.

Материал и методы

Экспериментальные исследования осуществляются в виварии ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России на белых лабораторных крысах-самцах трех возрастных периодов (неполовозрелого, репродуктивного и периода выраженных старческих изменений) согласно классификации возрастной периодизации животных [5]. Крысы, как объект морфологического исследования, были выбраны по нескольким причинам. Во-первых, лабораторная белая крыса, *Rattus norvegicus f. domesticus*, – универсальное животное, у которого развитие, строение и кровоснабжение эндокринных желез, синтез гормонов и механизмы регуляции сходны с таковыми у человека [6]. Во-вторых, небольшая масса крыс, их относительно простое содержание в условиях вивария, частая смена генераций и устойчивость к инфекционным заболеваниям позволяют проводить массовые опыты [5]. Содержание и манипуляции над животными выполняются в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных с учетом положений Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза. В зависимости от вида воздействия и продолжительности эксперимента животные подразделяются на группы, по 6 особей в каждой. Сроки наблюдений варьируют и могут составлять 1, 7, 15, 30, 60, 90, 180 суток. Забой животных проводится в одно и то же время. Непосредственно после эфирного наркоза крыс взвешиваем и декапитируем. Щитовидную железу выделяем вместе с трахеогортанным комплексом, препарируем, взвешиваем и фиксируем в 10% растворе

нейтрального формалина. Полученные результаты регистрируем в протоколах забора материала. После фиксации препараты промываем в проточной воде в течение часа. Изготавливаем гистологические срезы толщиной 3-4 мкм, окрашиваем препараты гематоксилином и эозином. Анализ цифровых данных проводим с помощью компьютерной программы для морфометрических исследований «Master of Morphology» [7] (рис.1).

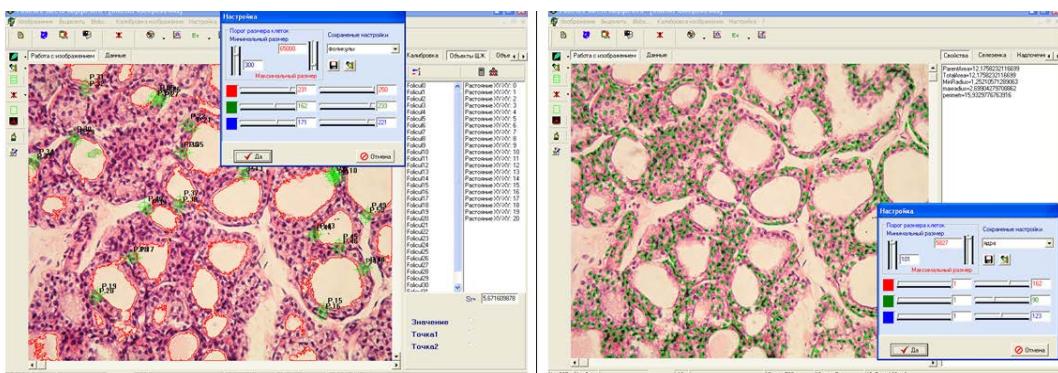


Рис. 1. Микрофотография щитовидной железы крысы. Окраска: гематоксилин и эозин. Внешний вид окна программы «Master of Morphology» при гистоморфометрии фолликулов и ядер тироцитов щитовидной железы на гистологическом срезе.

Для электронномикроскопического исследования кусочки щитовидной железы размером 1мм³ фиксируем в 2,5% растворе глютарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2, а затем в 1% осмievом фиксаторе по Палладе. После дегидратации в растворах этанола нарастающей концентрации и абсолютном ацетоне материал заливаем смесью эпоксидных смол эпон-аралдит. На ультрамикротоме изготавливаем полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм и окрашиваем метиленовым синим. Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяем уровень трийодтиронина и тироксина в крови. Количественные данные, полученные в результате исследования, обрабатывали с использованием стандартных методов вариационной статистики. Для интерпретации полученных результатов проводим параметрический анализ с целью определения наличия и степени значимости изменений. С помощью пакета статистических программ для Microsoft Office Excel для каждого исследуемого параметра определяем среднее арифметическое значение (M), среднее квадратическое отклонение (si), ошибку среднего арифметического (m), точность измерений (T), разницу средних арифметических в опыте и контроле ($M_o - M_k$), процентное отклонение от контроля и значимость отклонений (t). На основании t-критерия Стьюдента определяем границы доверительного интервала. Различия между параметрами в опыте и контроле при t в диапазоне от 2,23 до 3,16 считали статистически значимыми для 95% доверительного уровня с вероятностью ошибки менее 5% ($p < 0,05$), при t от 3,17 до 4,58

- для 99% доверительного уровня с вероятностью ошибки менее 1% ($p<0,01$), при t свыше 4,59 – для 99,9% доверительного уровня с вероятностью ошибки менее 0,1% ($p<0,001$) (рис. 2).

Высота тироцитов						Высота тироцитов						Высота тироцитов								
сер.N	1_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки	сер.N	2_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки	сер.N	3_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки
достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина	достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина	достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина
средн.							средн.							средн.						
интервал достн.	0,12	0,18	0,12	0,17	0,19	0,19	интервал достн.	0,09	0,19	0,09	0,15	0,08	0,19	интервал достн.	0,09	0,16	0,09	0,19	0,09	0,19
крыса_1	5,42	6,12	5,42	6,12	6,12	6,12	крыса_1	5,39	5,11	5,93	6,93	6,93	6,93	крыса_1	5,99	5,11	5,99	5,29	5,11	5,41
крыса_2	5,27	5,80	5,27	5,80	6,00	6,00	крыса_2	5,29	5,42	5,65	6,86	6,86	6,86	крыса_2	5,32	5,78	5,29	5,42	4,98	5,36
крыса_3	5,27	5,75	5,27	5,75	5,75	5,75	крыса_3	5,29	5,04	6,00	6,65	6,65	6,65	крыса_3	6,21	5,42	5,29	5,04	5,34	5,34
крыса_4	5,39	6,23	5,39	6,14	5,14	5,14	крыса_4	5,45	6,03	6,26	6,28	6,28	6,28	крыса_4	6,18	5,98	5,48	6,03	5,34	5,34
крыса_5	5,91	5,15	5,91	5,15	5,15	5,15	крыса_5	5,62	5,07	6,10	6,03	6,03	6,03	крыса_5	5,46	6,15	5,52	5,93	5,16	5,16
крыса_6	5,88	5,17	5,20	5,07	5,07	5,07	крыса_6	5,68	4,80	6,45	6,45	6,45	6,45	крыса_6	5,22	5,00	5,00	5,07	5,00	5,07
ср ариф. М	5,51	5,75	5,41	5,57	5,81	5,81	ср ариф. М	5,33	5,56	5,98	6,55	6,55	6,55	ср ариф. М	5,90	5,77	5,33	5,56	5,20	5,20
ср кв отлг. М	0,28	0,40	0,26	0,39	0,42	0,42	ср кв отлг. М	0,18	0,43	0,23	0,19	0,19	0,19	ср кв отлг. М	0,49	0,35	0,18	0,43	0,21	0,21
ошиб. М	0,12	0,18	0,12	0,17	0,19	0,19	ошиб. М	0,08	0,19	0,09	0,15	0,08	0,08	ошиб. М	0,18	0,16	0,08	0,19	0,09	0,09
точ. изм. Т	2,74	3,12	2,14	3,13	3,35	3,35	точ. изм. Т	1,52	3,47	1,57	2,23	1,21	1,21	точ. изм. Т	3,06	2,72	1,52	3,47	1,82	1,82
ср архон. Мк	5,38	5,04	5,04	6,14	6,29	6,29	ср архон. Мк	6,25	6,44	6,80	7,06	7,06	7,12	ср архон. Мк	6,89	6,74	6,04	5,76	5,62	5,20
откл от %	2,48	0,47	0,85	0,85	-1,75	-1,75	откл от %	-1,43	0,39	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	откл от %	-1,39	-14,16	-1,71	-5,54	2,76	2,76
Мо-Мк	0,13	0,03	0,51	0,56	0,71	0,71	Мо-Мк	0,92	0,98	0,62	0,51	0,53	0,53	Мо-Мк	0,99	0,95	0,71	0,20	0,14	0,14
дост отк. t	0,99	0,11	3,20	2,66	3,64	3,64	дост отк. t	3,23	3,38	2,47	2,85	2,42	2,42	дост отк. t	3,53	3,24	3,31	0,78	1,22	1,22
округл 1 >23 в N	0,99	0,11	3,20	2,66	3,64	3,64	округл 1 >23 в N	3,23	3,38	2,47	2,85	2,42	2,42	округл 1 >23 в N	3,53	3,24	3,31	0,78	1,22	1,22
ошиб.Мк	0,04	0,17	0,11	0,12	0,10	0,10	ошиб.Мк	0,27	0,18	0,10	0,20	0,20	0,20	ошиб.Мк	0,21	0,25	0,20	0,18	0,09	0,09

Высота тироцитов						Высота тироцитов						Высота тироцитов								
сер.N	1_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки	сер.N	2_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки	сер.N	3_ЧК	1 сутки	7 сутки	15 сутки	30 сутки	60 сутки
достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина	достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина	достоверность:		истина	истина	истина	истина	истина
средн.							средн.							средн.						
интервал значен.	0,04	0,11	0,11	0,12	0,10	0,10	интервал значен.	0,27	0,16	0,23	0,10	0,09	0,09	интервал значен.	0,69	0,72	6,04	5,78	5,08	5,08
крыса_1	5,39	5,73	5,02	6,14	6,29	6,29	крыса_1	6,25	6,44	6,60	7,06	7,12	7,12	крыса_1	6,49	6,40	6,15	6,74	4,98	4,98
крыса_2	5,29	5,42	5,65	6,63	6,76	6,76	крыса_2	6,96	6,19	7,02	7,06	6,74	6,74	крыса_2	6,75	6,75	6,63	6,21	5,22	5,22
крыса_3	5,29	6,04	5,65	5,80	6,11	6,11	крыса_3	5,56	6,25	6,41	6,68	6,89	6,89	крыса_3	7,11	6,11	5,99	5,49	5,15	5,15
крыса_4	5,48	6,03	6,20	6,15	6,55	6,55	крыса_4	6,46	6,95	6,35	7,11	7,50	7,50	крыса_4	7,55	7,55	6,15	5,21	5,13	5,13
крыса_5	5,52	5,97	6,10	6,13	6,19	6,19	крыса_5	5,58	6,18	6,30	7,08	7,15	7,15	крыса_5	7,19	7,19	6,13	5,68	4,85	4,85
крыса_6	5,31	5,80	5,91	5,88	6,33	6,33	крыса_6	6,95	6,16	7,16	7,19	7,82	7,82	крыса_6	6,33	6,33	5,28	6,13	5,09	5,09

Рис. 2. Внешний вид окна страницы Excel по каждому изучаемому параметру. На рисунке отображен параметр «Высота тироцитов» щитовидной железы каждой крысы трех возрастных периодов во все сроки эксперимента в опыте и контроле, указан процент отклонений и определена статистическая значимость результатов.

С помощью прикладных программ «Statistica 10.0» применяем непараметрические методы статистической обработки результатов. Подчиненность полученных результатов нормальному закону распределения проверяем посредством нормальных вероятностных графиков с помощью критерия Шапиро-Уилка и однородности дисперсий по группам с помощью критерия Левена. Для выявления взаимозависимости параметров в пределах экспериментальных групп применяем корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции Браво-Пирсона (r), а для выявления зависимости параметров от влияния экспериментальных воздействий, периода реадаптации и возраста применяем многофакторный дисперсионный анализ с проверкой гипотез о равенстве средних с помощью критериев Краскела-Уоллиса и Шеффе. Оценку степени влияния факторов на исследуемые параметры проводим с помощью коэффициента детерминации (R^2).

Результаты и обсуждение

Благодаря современным методам исследования получаем новые данные об анатомическом и гистологическом строении щитовидной железы, с детальной расшифровкой ее структурной организации и анализом возрастных изменений гормонального статуса животных. Органометрический метод исследования позволяет изучить макроструктуру органа и выявить морфологические изменения на органном уровне организации. Органометрический анализ щитовидной железы включает в себя: определение абсолютной

массы (мг); измерение длины, ширины и толщины (мм); вычисление объема (мм^3) по формуле: $V=\pi ABC/6$, где А, В, С – линейные размеры (мм); вычисление плотности ($\text{мг}/\text{мм}^3$), как соотношение абсолютной массы к объему. Так, например, средний показатель абсолютной массы щитовидной железы крыс увеличивается с возрастом. У 3-месячных животных масса органа равна $11,15\pm0,37$ мг, причем вес правой ($5,66\pm0,20$ мг) и левой ($5,49\pm0,17$ мг) долей практически одинаков. К 5 месяцам данный показатель увеличивается до $13,94\pm0,12$ мг, из которых правая доля весит $7,25\pm0,03$ мг, а левая – $6,69\pm0,12$ мг. Максимальная масса органа зарегистрирована в 22 месяца – $21,15\pm0,38$ мг, причем с равнозначным весом правой ($10,56\pm0,11$ мг) и левой долей ($10,59\pm0,28$ мг). Метод светооптической микроскопии применяем для изучения микроструктуры органа и оценки его морфологической перестройки на тканевом уровне организации. Гистоморфометрический метод позволяет изучить структурные компоненты на клеточном уровне. Гистоморфометрический анализ щитовидной железы включает в себя: определение площади фолликулов (мкм^2); площади коллоида (мкм^2); площади фолликулярного эпителия (мкм^2); измерение высоты тироцитов (мкм); большего диаметра фолликулов (мкм); меньшего диаметра фолликулов (мкм); площади ядер тироцитов (мкм^2); подсчет количества ядер тироцитов. Метод электронной микроскопии позволяет изучить ультраструктуру различных типов клеток и оценить их морфологическую перестройку на субклеточном уровне организации. Математические методы применяем для расчета относительных величин, коэффициентов и индексов активности органа. На макроскопическом уровне вычисляем относительную массу щитовидной железы (%), как процентное соотношение абсолютной массы к массе тела, и рассчитываем коэффициент асимметрии (Ка) для массы, длины, ширины, толщины, объема и плотности по формуле: $Ka = ((D_d - D_s) / (D_d + D_s)) \times 100$, где D_d – величина параметра в правой доле, D_s – величина параметра в левой доле. При доминировании параметра в правой доле Ка положителен, при доминировании в левой – Ка отрицателен. Так, например, коэффициент асимметрии массы щитовидной железы положителен во все периоды наблюдений. Максимальное значение Ка на уровне $6,18\pm1,49\%$ зафиксировано у 7-месячных крыс. На микроскопическом уровне определяем ядерно-цитоплазматический индекс, как соотношение площади ядер к площади цитоплазмы, фолликулярно-коллоидный индекс, как соотношение площади фолликулярного эпителия к площади коллоида, и индекс накопления коллоида, как соотношение диаметра фолликулов к двойной высоте тироцитов.

Заключение и выводы

Данная методология исследования морфогенеза щитовидной железы может быть основой для решения конкретных научных задач экспериментальной морфологии и

достижения цели любого экспериментального исследования. Представленная последовательность действий применима как в научных исследованиях, так и учебном процессе на кафедрах анатомии человека и животных, гистологии, цитологии и эмбриологии, патоморфологии, эндокринологии в высших учебных заведениях. Знания изменений моррофункционального состояния щитовидной железы на всех уровнях ее структурной организации могут стать морфологическим субстратом, подтверждающим клиническую картину, либо позволяют снизить риск развития эндокринных нарушений, прогнозировать возможные осложнения и процессы восстановления организма. Фундаментальные исследования могут быть использованы при разработке новых методов профилактики и коррекции эндокринного статуса в клинической медицине, а именно, в педиатрии, терапии, геронтологии, эндокринологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковешніков, В.Г. Ультрабудова органів імунної та ендокринної систем в умовах імуностимуляції / В.Г. Ковешніков, С.А. Кащенко, О.С. Болгова // Biomedical and Biosocial Anthropology. 2004. № 2. С. 165-168.
2. Ковешников, В.Г. Моррофункциональные изменения щитовидной железы крыс различных возрастных периодов при воздействии на организм глюокортикоидов и бисфосфоната «Зомета» / В.Г. Ковешников, К.А. Фомина // Український морфологічний альманах. 2007. Т. 5, № 1. С. 44-48.
3. Ковешников, В.Г. Алгоритм морфологического исследования щитовидной железы / В.Г. Ковешников, К.А. Фомина // Таврический медико-биологический вестник. 2008. Т. 11, № 3, Ч. 1. С. 65-68.
4. Ковешніков, В.Г. Особливості морфогенезу ендокринної, імунної та кісткової систем під впливом летучих компонентів епоксидних смол / В.Г. Ковешніков, В.І. Лузін, К.О. Фоміна // Український медичний альманах. 2011. Т. 14, № 3. С.25-27.
5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария В.А., Западнюк Б.В. – Киев: В. школа, 1983. – 383 с.
6. Ноздрачев, А.Д. Анатомия крысы (лабораторные животные) / А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Полянский. – СПб.: Лань, 2001. – С.159.
7. Овчаренко, В.В. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Master of Morphology» / В.В.Овчаренко, В.В. Маврич // Свідоцтво про реєстрацію автор. права на винахід № 9604, дата реєстрації 19.03.2004.
8. Экологическая морфология органов эндокринной, иммунной и костной систем в условиях хронического ингаляционного влияния летучих компонентов эпоксидных смол / В.Г. Ковешников, В.И. Лузин, К.А. Фомина [и др.] // Астраханский медицинский журнал. 2013. Т. 8, №1. С. 128-131.

Сведения об авторах статьи:

Торба Александр Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой госпитальной хирургии, урологии и онкологии, ректор ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт.

Луки Минздрава России, 291045, Луганская Народная Республика, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г, e-mail: rector.lgmu@yandex.ru.

Фомина Ксения Александровна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии, декан факультета по работе с иностранными студентами ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России, 291045, Луганская Народная Республика, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г, e-mail: anatom.kf@mail.ru.

Беров Вячеслав Иванович – соискатель кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России, 291045, Луганская Народная Республика, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г.