

На правах рукописи

ХАГУЕВА
Айшат Алиевна

**Морфологические изменения миокарда крыс
при экспериментальном тиреотоксикозе**

06.02.01 – Диагностика болезней и терапия животных,
патология, онкология и морфология животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь - 2013

Работа выполнена в
ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Боташева Валентина Салиховна

Официальные оппоненты: **Порублев Владислав Анатольевич**
доктор биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», профессор кафедры паразитологии,
ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора
С.Н. Никольского

Шантыз Алий Юсуфович
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет», профессор кафедры анатомии, ветеринарного акушерства и хирургии

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»**

Защита диссертации состоится «4» октября 2013 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «__»_____2013 г. и размещен на сайтах: ВАК Минобразования и науки РФ <http://vak.ed.gov.ru/> «__»_____2013 г. ФГБОУ ВПО «Ставропольский ГАУ»: <http://www.stgau.ru/> «__»_____2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

На сегодняшний день заболевания щитовидной железы занимают одно из ведущих мест среди эндокринных нарушений. В развитии тиреоидной патологии играют роль такие факторы, как неблагоприятная экологическая обстановка, изменение микроэлементного состава окружающей среды, наследственная предрасположенность. Актуальность этой проблемы обусловлена также многообразием клинических проявлений, сопровождающих данный вид эндокринопатий, что неизменно привлекало внимание исследователей (Старкова Н.Т., 1996; Зефирова Г.С., 1999).

Одним из значимых нарушений функции щитовидной железы является тиреотоксикоз. Тиреотоксикоз – это синдром, наличие которого связано с повышенным содержанием тиреоидных гормонов в крови, что встречается при различной патологии или экзогенном избыточном поступлении тиреоидных гормонов. В литературе последних десятилетий имеются указания на неуклонный рост заболеваний, сопровождающихся синдромом тиреотоксикоза (Герасимов Г.А., 1999; Калинин А.П., 2000; Дедов И.И., 2002).

Метаболические изменения, возникающие при тиреотоксикозе, приводят к нарушениям функции многих органов и систем, в первую очередь, сердечно-сосудистой системы. Кардиомиопатия является частым и серьезным осложнением тиреотоксикоза, и зачастую, выходит на первый план при данной патологии. Поражение сердечно-сосудистой системы нередко приводит к утрате трудоспособности, а при тяжелом течении – к смерти пациентов (Романова Т.Б., 1993; Зыкова Т.А., 1996; Панченкова Л.А., 2000).

Патологические изменения сердечно-сосудистой системы при тиреотоксикозе сопровождаются появлением сложных разнообразных нарушений ритма, артериальной гипертензией, дисгормональной кардиомиопатией с развитием хронической сердечной недостаточности. Данные нарушения возникают под токсическим действием избытка тиреоидных гормонов и нередко определяют течение и исход заболевания (Балаболкин М.И., 1995; Джанашия П.Х., 2004; Шульгина В.Ю., 2006).

В большинстве работ, посвященных проблеме тиреотоксикоза, основное внимание уделяется клиническим проявлениям и механизмам формирования «тиреотоксического сердца». Между тем недостаточно изучены морфологические изменения, возникающие в сердце при данной патологии, а также, динамика структурных нарушений в зависимости от тяжести тиреотоксикоза.

Указанное состояние проблемы явилось основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования:

Изучить характер морфологических изменений в миокарде крыс при экспериментальном тиреотоксикозе.

Задачи исследования:

1. Определить характер морфологических изменений щитовидной железы крыс при экспериментальном тиреотоксикозе.
2. Изучить патогистологические изменения миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.
3. Выявить иммуногистохимические изменения при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.
4. Изучить патогистологические изменения в миокарде крыс при экспериментальном тиреотоксикозе с применением антиоксидантов.
5. Доказать протекторное действие антиоксидантов при тиреотоксической кардиомиопатии.

Научная новизна работы.

Создана экспериментальная модель тиреотоксикоза на белых крысах-самцах путем введения тиреоидных гормонов.

Уточнены имеющиеся сведения по морфологической структуре щитовидной железы в норме и получены новые данные о характере повреждения железы при тиреотоксикозе.

Изучены патогистологические изменения миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.

Впервые исследованы иммуногистохимические изменения Ki-67, P-53 и миоглобина при тиреотоксическом поражении сердца.

Теоретически обосновано и практически доказано протекторное действие антиоксидантов при тиреотоксическом повреждении миокарда.

Практическая значимость работы.

Доказано протекторное действие антиоксидантов альфа-токоферола и мексидола при тиреотоксическом повреждении миокарда. Результаты исследования могут быть использованы для совершенствования методов лечения и профилактики тиреотоксической кардиомиопатии.

Полученные данные о характере морфологических изменений щитовидной железы и миокарда при тиреотоксикозе могут использоваться в научных целях, при составлении учебных и справочных пособий, чтении лекций и проведении практических занятий по патологической анатомии, клинической диагностике и терапии. Результаты иммуногистохимических

исследований могут использоваться как диагностические критерии тиреотоксического повреждения миокарда у животных.

Внедрение результатов исследования.

Основные положения и выводы диссертации внедрены и используются в учебном процессе в ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет»; в ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»; в ГБОУ ВПО «Северо-Кавказская гуманитарно-технологическая академия»; в работу патологоанатомического отделения МБУЗ городской клинической больницы скорой медицинской помощи г.Ставрополя.

Апробация результатов исследования.

Результаты диссертации докладывались и обсуждались в материалах VII, VIII, IX и X научно-практических конференциях врачей КЧР (Черкесск, 2009, 2010, 2011, 2012 г.г.), семинара «Морфологические основы гомеостаза и патологии» (Ставрополь, 2012 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические проблемы адаптации», Ставрополь, 2013 г.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 из них в изданиях, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментальный тиреотоксикоз крыс, вызванный применением L-тироксина, сопровождается выраженными морфофункциональными изменениями щитовидной железы и миокарда.
2. Использование антиоксидантов при тиреотоксикозе крыс оказывает кардиопротекторное действие, предотвращая развитие патоморфологических изменений миокарда.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 116 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов собственных исследований, выводов, практических предложений и списка литературы. Работа иллюстрирована 52 рисунками 5 таблицами. Список литературы включает 203 источника, в том числе 132 отечественных и 71 зарубежных авторов.

2. Материал и методы исследования.

Исследование проведено с 2008 по 2012 гг. в условиях лаборатории кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины и вивария ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет».

Объектом исследования служили 104 белые крысы-самцы линии Вистар весом 250-300 грамм, половозрелые (в возрасте 8-9 месяцев). Крысы содержались в оптимальных условиях, для кормления использовали рационы для лабораторных животных в соответствии с ГОСТ Р 50258-92. При проведении эксперимента соблюдали правила, указанные в следующих нормативных документах: правила лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в РФ; Федеральный закон «О лекарственных средствах» N86-ФЗ от 22.06.1998 (Собрание законодательства РФ от 29.06.1998 г., N26, ст. 3006; от 13.01.2003 г. N2 ст. 167; от 10.01.2000 г., N2, ст. 126; от 07.01.2002 г. (Часть I), N1, ст. 2) и положение о Министерстве здравоохранения РФ, утвержденное постановлением Правительства РФ от 29.04. 2002 N 284 (Собрание законодательства РФ, 06.05.2002 г., N18, ст. 1771), а также в соответствии с ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96. Для проведения эксперимента использовали клинически здоровых животных. В ходе эксперимента соблюдали международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных.

На лабораторных животных была получена экспериментальная модель тиреотоксикоза путем ежедневного введения L-тироксина в дозе 1,6 мг на 1 кг массы тела. Продолжительность опыта составила 60 дней. Крыс выводили из эксперимента через 3 суток, 7 суток, 14 суток, 21-и сутки, 28-суток, 45 суток, 60 суток.

Подопытные животные были разделены на 3 группы:

I экспериментальная группа: 26 крыс, которая ежедневно вводили L-тироксин в расчете 2 мкг на кг веса.

II экспериментальная группа: 26 крыс, которым ежедневно вводили L-тироксин и антиоксидант альфа-токоферол в расчете 10-15 мг на кг веса.

III экспериментальная группа: 26 крыс, которым ежедневно вводили L-тироксин и антиоксидант мексидол в расчете 0,3 мг на кг веса.

В качестве контрольного материала использовали 26 крыс, которые содержались в одинаковых условиях с подопытными крысами, но препараты им не вводили (таблица 1).

Таблица 1

Распределение лабораторных животных (крыс) по группам

№	Наименование групп	Количество лабораторных животных	Сроки наблюдения
1	Контрольная группа	26	3,7,14,21,45,60 суток
2	I экспериментальная группа крыс, которым вводили L-тироксин	26	3,7,14,21,45,60 суток
3	II экспериментальная группа крыс, которым вводили L-тироксин и а-токоферол	26	3,7,14,21,45,60 суток
4	III экспериментальная группа крыс, которым вводили L-тироксин и мексидол	26	3,7,14,21,45,60 суток
Итого		104	

Для изучения гематологических показателей крыс отбирали образцы крови их хвостовой вены. В ходе исследования были определены: количество эритроцитов, лейкоцитов, лейкограмма, гемоглобин на ветеринарном гематологическом анализаторе АВАСУS (Diatron, Австрия). Биохимические показатели сыворотки крови (общий белок, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ), глюкозы) определяли на анализаторе Flexor Junior (Vital Scientific, Нидерланды) с помощью наборов для биохимического анализа производства analyticon biotechnologies Ag (Германия).

Определение уровня гормонов щитовидной железы T_3 (общий трийодтиронин), T_4 (общий тироксин) и ТТГ (тиреотропный гормон) определяли методом иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов Т-3, Т-4, ТТГ (DRG International inc, Германия).

Для проведения морфологических исследований осуществлялся убой крыс, изъятие щитовидной железы и миокарда.

Для гистологического исследования были отобраны образцы миокарда левого и правого желудочков, межжелудочковой перегородки. Кусочки миокарда фиксировали в 10 % нейтрофильном формалине в течении 5 суток, затем промывали в проточной воде, проводили через спирты возрастающей крепости и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизон, толуидиновым синим, по Малори в модификации Гейденгайна, ШИК-реакция.

Для иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 10% растворе забуференного формалина с последующим приготовлением парафиновых блоков. С каждого блока были сделаны серийные срезы толщиной 5 мкм. Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой иммунопероксидазным методом с восстановлением антигенной специфичности, воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин. Срезы депонировали по стандартной схеме, обрабатывали 5 минут в 3% растворе H_2O_2 для блокирования эндогенной пероксидазы, затем промывали в дистиллированной воде в течение 5 минут. После двухчасовой обработки в микроволновой печи в режиме 750 Вт срезы промывали в фосфатном буфере (pH-7,6) по 5 минут и инкубировали с первичными моноклональными антителами в течение 18 часов при температуре +4 градуса С. После этого срезы опять промывали в фосфатном буфере и инкубировали с вторичными антителами мечеными биотином в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем срезы окрашивали диаминобензидином и заключали в эпоксидную смолу. В качестве контроля использовали ткань миокарда без нанесения первичных антител.

Морфометрическое исследование проводили в соответствии с принципами системного подхода в изучении количественно-пространственной организации морфологических структур в норме и патологии по методам Г.Г. Автандилова (1990, 1996, 2002).

Статистическая обработка результатов исследования произведена с помощью пакета программ Ststistica 6.0 for Windows, программы статистического анализа «BIOSTAT» (1998) и модуля Excel пакета Microsoft Office 2007 Enterprise в среде Windows Vista Home Premium. Для обработки данных исследования использовались методы описательной статистики с целью получения среднего показателя (M) с последующим проведением множественного парного сравнения с помощью критерия Ньюмена-Кейлса при 5 % уровне значимости различий.

3. Результаты исследований и их анализ

3.1. Динамика показателей гормонального статуса крыс в норме и при моделировании тиреотоксикоза

Модель тиреотоксикоза в эксперименте создавали путем ежедневного введения L-тироксина лабораторным животным. Для подтверждения наличия экзогенного экспериментального тиреотоксикоза определяли уровень тиреоидных гормонов в крови: общего трийодтиронина (Т3), общего

тироксина (Т4), а также тиреотропного гормона (ТТГ) в различные сроки эксперимента.

Результаты исследования показали, что на 3-е сутки эксперимента показатели Т3, Т4, ТТГ аналогичны с показателями контрольной группы. На 7-е сутки отмечается незначительное и статистически недостоверное повышение уровня гормонов в крови крыс. На 14-е сутки впервые отмечено достоверное повышение Т3 и Т4. На 21-е и 28-е сутки уровень Т3 и Т4 в крови крыс достоверно увеличивается в 2 раза по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Показатели уровня гормонов щитовидной железы крыс при моделировании тиреотоксикоза

Виды гормонов	Контр оль	Сроки эксперимента (сутки)						
		3-е М _{±m}	7-е М _{±m}	14-е М _{±m}	21-е М _{±m}	28-е М _{±m}	45-е М _{±m}	60-е М _{±m}
Трийодти ронин (Т3)	2,06± 0,5	2,07± 0,08	2,96± 0,07	3,19± 0,03*	3,61± 0,03*	4,27± 0,01*	4,69± 0,04*	5,23± 0,01*
Тироксин (Т4)	12,23± 0,03	12,13± 0,07	12,32± 0,75	13,17± 0,04*	15,31± 0,02*	18,27± 0,03*	21,45± 0,03*	23,34± 0,03*
Тиреот ропный гормон (ТТГ)	0,05± 0,03	0,05± 0,05	0,05± 0,04	0,05± 0,02*	0,04± 0,01*	0,03± 0,02*	0,03± 0,01*	0,02± 0,01*

Примечание: статистическая значимость различий с контрольным материалом обозначена* - $p < 0,05$.

На 45-е сутки уровень Т3 и Т4 увеличился и достигает высоких цифр. На 60-е сутки отмечается повышение содержания гормонов щитовидной железы почти в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, при введении L-тироксина уровень гормонов в крови у лабораторных животных повышается и достигает высоких цифр к концу эксперимента. Достоверное повышение гормонов впервые зафиксировано на 14-е сутки. Полученные данные свидетельствуют о развитии экспериментального тиреотоксикоза.

Уровень гормонов щитовидной железы в крови регулируется тиреотропным гормоном. Повышение уровня Т3 и Т4 приводит к снижению уровня ТТГ. На 3-и и 7-е сутки уровень ТТГ не изменяется и соответствует показателям контрольной группы.

Начиная с 14-х суток наблюдается постепенное снижение показателей ТТГ, на 45-е сутки уровень ТТГ уменьшается почти в 2 раза по сравнению с

контрольной группой. Значительное снижение ТТГ выявлено на 60-е сутки. Полученные данные свидетельствуют о снижении секреции ТТГ ослаблении стимуляции функции щитовидной железы гипофизом.

Гематологические показатели крыс при тиреотоксикозе имеют свои особенности (таблица 3).

Таблица 3

Гематологические показатели крыс при тиреотоксикозе

Гематологические показатели	Сроки эксперимента (сутки)							
	Контроль M _{±m}	3-е M _{±m}	7-е M _{±m}	14-е M _{±m}	21-е M _{±m}	28-е M _{±m}	45-е M _{±m}	60-е M _{±m}
Эритроциты x 10 ¹² /л	4,74 ±0,20	4,29 ±0,08	4,57 ±0,03	4,46 ±0,02*	4,34 ±0,03*	4,39 ±0,02*	4,28 ±0,02*	4,15 ±0,03*
Гемоглобин г/л	150,00 ±0,05	152,24 ±0,85	154,16 ±1,06*	151,80 ±0,03*	145,63 ±0,04*	144,42 ±0,01*	143,28 ±0,03*	141,72 ±0,01*
Лейкоциты x 10 ⁹ /л	7,25 ±0,51	7,20 ±0,31	7,15 ±0,24	6,24 ±0,03*	5,14 ±0,03*	4,56 ±0,04*	4,01 ±0,03*	3,76 ±0,02*
Тромбоциты x 10 ⁹ /л	317,00 ±0,44	311,80 ±0,51	309,20 ±0,84*	307,00 ±0,01*	290,01 ±0,02*	218,17 ±0,03*	210,04 ±0,02*	194,18 ±0,03*
СОЭ	2,57 ±0,14	2,60 ±0,38	2,70 ±0,12	2,94 ±0,03*	3,00 ±0,03*	3,71 ±0,02*	4,82 ±0,04*	5,25 ±0,04*

Примечание: статистическая значимость различий с контрольным материалом обозначена* - p<0,05.

С нарастанием тяжести процесса постепенно развивается лейкопения и тромбоцитопения. Количество лейкоцитов и тромбоцитов достигает минимального значения к концу эксперимента (на 60-е сутки). Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) при тиреотоксикозе возрастает, максимальное значение СОЭ наблюдается в конце эксперимента.

Количество эритроцитов и уровень гемоглобина к концу эксперимента постепенно снижается.

3.2. Патогистологические изменения щитовидной железы крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике.

В результате исследования установлено, что через 3 суток после начала эксперимента в щитовидной железе крыс патогистологические изменения не выявлены. Диаметр ядер тиреоцитов составляет 4,5±0,03 мкм, а их высота равна 0,9±0,02 мкм (таблица 4).

Таблица 4

**Морфологические показатели щитовидной железы крыс,
получавших L-тироксин**

Показатели	Контроль	Сроки наблюдений (сутки)						
		3	7	14	21	28	46	60
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
Диаметр ядер тироцитов	4,5±0,03	4,5±0,03	4,1±0,02	4,0±0,01*	3,9±0,02*	3,8±0,01*	3,8±0,02*	3,0±0,01*
Высота тироцитов	7,7±0,05	7,7±0,05	6,9±0,02	6,6±0,04*	6,4±0,01*	6,3±0,02*	6,3±0,02*	5,1±0,03*

Примечание: статистическая значимость различий с контрольным материалом обозначена* - $p < 0,05$.

Через 7 суток от начала эксперимента выявлена умеренная сосудистая реакция в виде полнокровия вен, стазов, плазматическое пропитывание стенок сосудов и плазморрагия. Отмечается увеличение числа крупных фолликулов, расположенных по периферии железы, имеющих выстилку кубическим эпителием и содержащих эозинофильный коллоид. В строме железы, преимущественно в перивенулярных пространствах наблюдается умеренный отек. Диаметр ядер тироцитов снижается до $4,1 \pm 0,02$ мкм, а высота тироцитов до $6,9 \pm 0,02$ мкм (таблица 4).

Через 14 суток от начала эксперимента сосудистые нарушения становятся более интенсивными. Отек распространяется на остальную часть стромы, но еще носит очаговый и неравномерный характер. В участках отека отмечается набухание коллагеновых волокон и их гомогенизация. В периферических отделах железы наблюдается увеличение количества крупных фолликулов. Диаметр ядер тироцитов достоверно уменьшается и составляет $3,8 \pm 0,01$ мкм, а их высота соответственно $6,6 \pm 0,02$ мкм (таблица 4).

Через 21-и сутки от начала эксперимента наблюдается уменьшение долек в размерах, атрофические и дистрофические процессы в фолликулярном эпителии по типу белковой гидропической дистрофии, отмечается набухание тироцитов, вакуолизация цитоплазмы. Апикальный край тироцитов становится неровный. В дистрофически измененных тироцитах наблюдается сморщивание ядра, уменьшение его в размерах.

В строме железы отмечается нарастание интенсивности отека, который принимает диффузный характер. Происходит набухание коллагеновых волокон, их гомогенизация, а местами фрагментация. В этих участках определяется дезорганизация основного вещества с накоплением гликозамингликанов и слабо положительной ШИК-реакцией. В сохранившихся участках стромы усиливаются репаративные процессы,

происходит более интенсивная пролиферация фибробластов и фибриллообразование. Диаметр ядер тиреоцитов и их высота снижается, достигая $3,9\pm 0,02$ мкм и $6,4\pm 0,01$ мкм соответственно (таблица 4).

Через 28 суток от начала эксперимента в щитовидной железе выявлены характерные структурные изменения, а именно: атрофия и деформация долек, уменьшение и атрофия фолликулярного эпителия, дистрофические изменения тиреоцитов. Увеличивается количество крупных фолликулов. В строме железы усиливается интенсивность отека, который распространяется на всю железу.

Через 45 суток от начала эксперимента в паренхиме железы нарушено дольковое строение. Дистрофические изменения фолликулярного эпителия приобретают распространенный характер, часть фолликулярных клеток подвергаются некробиозу и некрозу, остальные - атрофии. В строме железы отмечается разрастание соединительной ткани вследствие усиления пролиферативных процессов и фибриллогенеза, появляются очаги фиброза. Отек стромы сохраняется. Диаметр ядер тиреоцитов и их высота изменяются, $3,8\pm 0,02$ мкм и $6,3\pm 0,02$ мкм соответственно (таблица 4).

Через 60 суток от начала эксперимента в щитовидной железе обнаружены диффузные изменения в паренхиме и строме железы: выраженная атрофия и деформация долек, избыточное разрастание соединительной ткани с замещением паренхимы железы. В соединительной ткани встречаются атрофированные и деформированные дольки из мелких фолликулов без коллоида или же группы крупных расширенных фолликулов с эозинофильным коллоидом. Диаметр ядер тиреоцитов и их высота достигают минимума за весь период эксперимента, соответственно составляя $3,0\pm 0,01$ мкм и $5,1\pm 0,02$ мкм (таблица 4).

Таким образом, при длительном введении L-тироксина в щитовидной железе крыс I-й экспериментальной группы происходит постепенное уменьшение высоты тиреоцитов и диаметра их ядер и развиваются дистрофические и атрофические изменения паренхимы и склеротические изменения стромы.

3.3. Гистологическая характеристика миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в динамике (I-я экспериментальная группа).

Через 3 суток после ежедневного введения крысам L-тироксина в их миокарде патогистологические изменения не обнаружены. Гистологическая структура миокарда сохранена. Отек стромы выявлен преимущественно в перикапиллярных пространствах и частичного по ходу мышечных волокон.

В цитоплазме отдельных кардиомиоцитов определяются мелкие вакуоли, заполненные тканевой жидкостью.

Через 14 суток в строме миокарда отмечается усиление отека преимущественно в перивенулярных и перикапиллярных пространствах. Отмечается набухание основного вещества соединительной ткани с начальными признаками поверхностной дезорганизации. В цитоплазме кардиомиоцитов обнаружены мелкие вакуоли, заполненные прозрачной цитоплазматической жидкостью, то есть развивается гидропическая дистрофия. Внутриклеточный отек носит очаговый характер, наряду с дистрофически измененными кардиомиоцитами, встречаются непораженные клетки.

Через 21-е сутки отмечается усиление интенсивности отека. В строме миокарда встречаются многочисленные мелкие инфильтраты из лимфоцитов, гистиоцитов и фибробластов. В кардиомиоцитах наблюдаются признаки белковой гидропической дистрофии с развитием внутриклеточного отека, а также многочисленные очажки плазмолиза по всему миокарду. Через 28 суток интерстициальный отек усиливается и распространяется на весь миокард.

При этом основное вещество набухает и разрушается, появляются признаки дезорганизации соединительной ткани. При окраске толуидиновым синим наблюдается феномен метахромазии. Дистрофические изменения миокарда приобретают диффузный характер, отмечается усиленное рассасывание цитоплазмы, внутриклеточный отек. Очаги плазмолиза многочисленные и более крупные.

Через 45 суток после начала эксперимента усиливается интенсивность отека, который распространяется на весь миокард. Мышечные волокна истончаются, атрофируются и располагаются на значительном расстоянии друг от друга. В кардиомиоцитах усиливается внутриклеточный отек, появляются многочисленные крупные очаги плазмолиза. Наряду с миоцитоллизом в миокарде обнаружены признаки фрагментации волокон. Фрагментация волокон вначале имеет очаговый характер (28-е сутки), а на 45-е сутки становится диффузной. В строме миокарда увеличивается число клеточных инфильтратов, они становятся более крупными и располагаются преимущественно вокруг сосудов.

Через 60 суток отек миокарда становится очень интенсивным, наблюдается значительное истончение и атрофия кардиомиоцитов, усиливаются процессы миоцитоллиза. В миокарде определяются обширные участки растворения цитоплазмы, с образованием оптически пустых пространств, то есть развивается колликвационный некроз. В очагах миоцитоллиза и колликвационного некроза выявлена базофилия фибробластов и их отростков, гиперхромность ядер.

3.4. Гистологическая характеристика миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе с применением а-токоферола (II-я экспериментальная группа).

Через 3 суток от начала эксперимента в миокарде крыс определяется обычная гистологическая картина. Структурные изменения кардиомиоцитов не обнаружены. Отмечаются сосудистые нарушения в виде полнокровия и расширения вен, стазов, плазморрагии.

Через 7 суток от начала эксперимента патогистологические изменения в миокарде не обнаружены.

Через 14 суток от начала эксперимента на фоне применения токоферола в строме миокарда обнаружен небольшой отек преимущественно вокруг сосудов. В отдельных кардиомиоцитах выявлен внутриклеточный отек в виде скопления в цитоплазме вакуолей, заполненных тканевой жидкостью.

Через 21-и сутки в строме миокарда местами обнаружен отек, который носит очаговый характер и менее интенсивный, чем в I экспериментальной группе. В участках отека происходит набухание коллагеновых волокон и их гомогенизация, наблюдается поверхностная дезорганизация соединительной ткани с накоплением гликозамингликанов. Местами в цитоплазме кардиомиоцитов наблюдается гидропическая дистрофия, которая носит очаговый характер.

Через 28 суток на фоне ежедневного применения антиоксиданта токоферола отмечается частичное купирование сосудистых нарушений. В строме миокарда развивается отек, который распространяется почти на весь миокард, однако интенсивность отека менее выражена по сравнению с I-экспериментальной группой. В указанные сроки в миокарде наблюдается картина внутриклеточного отека и впервые на фоне применения токоферола появляются мелкие очажки плазмолиза (миоцитолита).

Через 45 суток на фоне применения токоферола в миокарде определяются диффузные изменения паренхимы и стромы. В строме миокарда наблюдается диффузный интерстициальный отек, коллагеновые волокна набухшие, гомогенизированы. Отмечается глубокая дезорганизация основного вещества соединительной ткани с наличием ШИК-положительных участков фибриноидного набухания и фибриноидного некроза. Наблюдается фибриноидное набухание и фибриноидный некроз стенок артерий. В миокарде отмечается гидропическая белковая дистрофия, которая принимает распространенный характер. На фоне внутриклеточного отека увеличивается число очагов плазмолиза.

Через 60 суток на фоне применения а-токоферола наряду с интерстициальным отеком, внутриклеточным отеком, миоцитолитом наблюдается усиление репаративных процессов, что проявляется

интенсивной пролиферацией фибробластов не только вокруг сосудов, но и в межмышечных соединительнотканых прослойках. Вокруг сосудов обнаружены участки разрастания нежной волокнистой соединительной ткани с формированием очагов фиброза.

Таким образом, при ежедневном применении антиоксиданта а-токоферола у крыс II-ой экспериментальной группы в первые 7 суток патогистологические изменения в миокарде не обнаружены. Первые признаки поражения миокарда (начинающийся перивентрикулярный отек единичных кардиомиоцитов) появились на 14-е сутки, позже, чем в I экспериментальной группе. Развернутая картина тиреотоксического сердца (диффузный внутриклеточный отек, миоцитоллиз) выявлена на 28-е сутки, т.е. позже, чем в I экспериментальной группе. Тяжелые деструктивные процессы с тотальной фрагментацией волокон и колликвационным некрозом миокарда во II экспериментальной группе крыс не обнаружены. Репаративные процессы с замещением поврежденных клеток миокарда соединительной тканью протекали более интенсивно по сравнению с I экспериментальной группой. Вышеуказанное позволяет утверждать, что а-токоферол оказывает протекторное действие на миокард в условиях тиреотоксикоза.

3.5. Гистологическая характеристика миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе с применением мексидола (III экспериментальная группа).

В первые 3,7 и 14 суток структурные изменения в миокарде крыс не обнаружены.

Через 21 сутки от начала эксперимента на фоне постоянного применения мексидола появились первые признаки отека вокруг сосудов, особенно вен и капилляров. В этих участках строма миокарда несколько разрыхлена, впервые обнаружены кардиомиоциты с наличием мелких вакуолей в цитоплазме. Вакуоли расположены в определенных участках миокарда, заполнены тканевой жидкостью и свидетельствуют о начинающемся внутриклеточном отеке. Ядра кардиомиоцитов не изменены, миофибриллы сохраняют обычную структуру.

Через 28 суток от начала эксперимента в строме миокарда обнаружены множественные участки отека небольших размеров. В участках отека наблюдается набухание коллагеновых волокон, склеивание их между собой, а также распад основного вещества. При гистохимическом исследовании обнаружены признаки поверхностной дезорганизации соединительной ткани и феномен метахромазии, отмечено увеличение число кардиомиоцитов с признаками внутриклеточного отека. Межуточный отек в сочетании с

внутриклеточным отеком и сосудистыми нарушениями свидетельствуют о развитии тиреотоксического сердца.

Через 45 суток от начала эксперимента на фоне ежедневного применения мексидола наблюдается распространение отека на весь миокард, купирование сосудистых нарушений. Строма миокарда разрыхлена, определяются мелкоочаговые лимфоцитарные инфильтраты. Инфильтраты состоят из лимфоцитов, гистиоцитов и фибробластов. Внутриклеточный отек носит распространенный характер. Однако, интенсивность отека значительно меньше, чем во II экспериментальной группе. В эти сроки впервые на фоне применения мексидола появляются мелкие очажки плазмолиза, представленные участками растворения цитоплазмы без повреждения сарколеммы.

Через 60 суток на фоне применения мексидола обнаружен фиброз стромы миокарда вследствие разрастания соединительной ткани.

Таким образом, при ежедневном применении антиоксиданта мексидола в миокарде крыс III экспериментальной группы развиваются стереотипные изменения: интерстициальный и внутриклеточные отеки, плазмолиз, фиброз и склероз. Однако, по сравнению с I и II экспериментальными группами эти изменения развиваются значительно позже (на 21-е сутки) и носят менее интенсивный характер. При применении мексидола очаги плазмолиза мелкие, развиваются позже (на 45-е сутки). Деструктивные изменения в миокарде не обнаруживаются. Репаративные процессы протекают более интенсивно и быстрее развивается фиброз.

3.6. Результаты иммуногистохимического исследования.

Для определения пролиферативной активности кардиомиоцитов использовался антиген Ki-67. Реакция в поврежденных кардиомиоцитах на Ki-67 отрицательная.

Ki-67 – это маркер пролиферирующих клеток на любой фазе цикла. Отрицательная реакция на Ki-67 свидетельствует об отсутствии митозов в кардиомиоцитах как в контрольном, так и в экспериментальном материале. Репаративные процессы в миокарде протекают путем гипертрофии клеток (гиперплазии ультраструктур).

Определение экспрессии протеина P53 показало отрицательные результаты, что указывает на отсутствие репарации поврежденной клетки, т.к. не происходит блокады клеточного цикла в G₁-S фазе. Экспрессия протеина P53 отрицательная на 7-е сутки эксперимента.

При иммуногистохимическом исследовании миокарда выявлено, что миогенин присутствует в хорошо дифференцированных мышечных клетках.

В контрольном материале миоглобин определяется в цитоплазме клеток.

На 3-и сутки при иммуногистохимическом исследовании обнаружено равномерное распределение миоглобина по всему миокарду. Экспрессия миоглобина в цитоплазме кардиомиоцитов почти не отличаются от контрольной группы.

На 7-е сутки эксперимента при иммуногистохимическом исследовании выявлено равномерное распределение миоглобина в цитоплазме кардиомиоцитов. В единичных кардиомиоцитах на месте вакуолей экспрессия миогенина не выявлена.

В указанные сроки количество кардиомиоцитов с отрицательной экспрессией миоглобина незначительное. В преобладающем большинстве клеток миокарда экспрессия миоглобина высокая.

На 14-е сутки в миокарде экспрессия миоглобина в непораженных кардиомиоцитах высокая, в дистрофически измененных кардиомиоцитах слабая или полностью отсутствует.

На 21-е сутки отмечается снижение экспрессия миоглобина в миокарде.

На 28-е сутки внутриклеточный отек распространяется на весь миокарда, то есть развивается диффузная гидropическая дистрофия кардиомиоцитов. Очаги миоцитолита становятся более крупными и многослойными.

На 45-е сутки экспрессия миоглобина в кардиомиоцитах резко снижена по всему срезу; в участках миоцитолита, очагах фрагментации волокон и колликовационного некроза экспрессия миоглобина полностью отсутствует.

На 60-е сутки в дистрофически измененных кардиомиоцитах экспрессия миогенина слабая, а в очагах деструкции миоглобина не определяется.

Таким образом, при иммуногистохимическом исследовании в миокарде тиреоидэктомированных крыс экспрессия Ki-67 и протеина P-53 отрицательные, что обусловлено блокадой клеточного цикла и отсутствием митозов в ядрах кардиомиоцитов. Экспрессия миоглобина в цитоплазме кардиомиоцитов хорошо выражена и достаточно равномерная в начале эксперимента, на 21-28-е сутки наблюдается снижение экспрессии миоглобина, а к концу эксперимента (60-е сутки) происходит значительное снижение экспрессии или полное ее отсутствие.

Результаты иммуногистохимического исследования выявили характер и динамику структурных изменений миокарда при тиреотоксикозе.

При использовании антиоксидантов токоферола или мексидола равномерная и высокая экспрессия миоглобина сохраняется в течение первых 28 суток, а начиная с 45 суток экспрессия миоглобина понижается, что свидетельствует о протекторном действии антиоксидантов.

Выводы

1. При длительном применении L-тироксина в организме подопытных животных развивается экспериментальный тиретоксикоза, сопровождающийся тяжелыми морфологическими изменениями в щитовидной железе и миокарде.
2. При экспериментальном тиретоксикозе в щитовидной железе крыс развиваются дистрофия и атрофия фолликулярного эпителия, диффузный отек стромы, гипотрофия и деформация долек, замещение паренхимы железы соединительной тканью, наблюдается уменьшение числа фолликулов и морфологическая перестройка структуры органа.
3. При экспериментальном тиреотоксикозе в миокарде лабораторных животных развивается стереотипная картина: дистрофические, деструктивные и атрофические изменения кардиомиоцитов, диффузный отек и фиброз стромы. Первые признаки тиреотоксикоза выявлены на 7-14 сутки, развернутая картина тиреотоксикоза развивается на 21-е сутки.
4. При применении антиоксидантов в миокарде подопытных животных признаки тиретоксикоза возникают на 28-е сутки, а развернутая картина – на 45-е сутки. Интенсивность и распространенность морфологических изменений менее выражены, деструктивные изменения в миокарде не обнаружены. Кардиопротекторное действие наиболее выражено при применении мексидола.
5. Применение антиоксидантов при экспериментальном тиреотоксикозе у лабораторных животных оказывает протекторное действие и предотвращает развитие тяжелых деструктивных изменений в миокарде.

Практические рекомендации

Представленные результаты по морфологии щитовидной железы и миокарда крыс при экспериментальном тиреотоксикозе могут быть использованы:

- в учебном процессе на кафедрах гистологии, патологической анатомии, а также анатомии, при оформлении аналогичных разделов учебных пособий и монографий;
- для углубленного познания характера структурных изменений щитовидной железы и миокарда при тиреотоксикозе;
- для диагностики и профилактики патологии щитовидной железы и сердечно-сосудистой системы.

Полученные данные по протекторному действию антиоксиданта мексидола при тиреотоксикозе могут быть использованы в ветеринарной медицине для лечения и профилактики болезней щитовидной железы и сердца у животных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Хатуева, А. А. Морфологические изменения в миокарде при экспериментальном тиреотоксикозе / А. А. Хатуева, В. С. Боташева // Физиологические проблемы адаптации: сб. науч. статей, посвященный 35-летию кафедры анатомии и физиологии и 85-летию со дня рождения основателя кафедры проф. И.А. Држевецкой. – Ставрополь, 2008. – С. 37-38.
2. Хатуева, А. А. Патологические изменения в миокарде при экспериментальном тиреотоксикозе / А. А. Хатуева // Фундаментальные исследования в биологии и медицине: сб. науч. трудов. – Ставрополь, 2009. – С. 163-166.
3. Хатуева, А. А. Характер морфологических изменений в миокарде при повышенном содержании тироксина в крови / А. А. Хатуева // Актуальные проблемы клинической медицины : материалы 7 науч.-практ. конф. Врачей Карачаево-Черкесской республики. – Черкесск, 2009. – С. 204-205.
4. Хатуева, А. А. Структурная перестройка миокарда при гипертиреозе / А. А. Хатуева // Рациональные пути решения социально-экономических и научно-технических проблем региона: 10 регион. науч.-практ. конф. – Черкесск, 2010. – Ч. 1. – С. 162-164.
5. **Хатуева, А. А. Тиреоидная кардиомиопатия / А. А. Хатуева, В. С. Боташева // Вестник Ставропольского государственного университета. – 2010. – Вып. 69 (4). – С. 216-218.**
6. Хатуева, А. А. Морфофункциональная характеристика тиреоидной кардиомиопатии / А. А. Хатуева, В. С. Боташева // Физиологические проблемы адаптации: сб. науч. статей Всероссийской конференции с междунар. участием, посвященной 40-летию кафедры анатомии и физиологии и 90-летию со дня рождения основателя кафедры проф. И.А. Држевецкой. – Ставрополь, 2013. – С. 42-44.
7. **Хатуева, А. А. Динамика гистологических изменений щитовидных желез при экспериментальном тиреотоксикозе / А. А. Хатуева, В. С. Боташева // Ветеринарная патология. – 2013. – № 1. – С. 101-103.**

Список сокращений

ТТГ – тиреотропный гормон;
Т3- трийодтиронин;
Т4 – тетраiodтиронин;
ДТЗ – диффузный токсический зоб;
БГ – болезнь Грейвса;
ЩЖ – щитовидная железа;
СД4 – маркер Т-лимфоцитов – хелперов;
СД8 – маркер Т-киллеров;
Ат-РТТГ – антитела к рецептору тиретропного гормона;
цАМФ – циклический аденозинтонофосфат;
ЦНС – центральная нервная система;
ФА – фолликулярная аденома;
АИТ – аутоиммунный тиреоидит;
ХАИТ – хронический аутоиммунный тиреоидит;
ИФН – интерферон;
Ил-2 – интерлейкин – 2;
а-ФНО – а - фактор некроза опухоли;
ТПО – тиреопероксидаза;
СТГ – соматотропный гормон;
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
ЭхоКГ – эхокардиография;
ЭКГ – электрокардиография.

Формат 60x84 1/16
Бумага офсетная

Подписано в печать 22.07.13
Усл.печ.л. 1,0
Тираж 100 экз.

Уч.-изд.л. 1,03
Заказ 332

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Ставропольский государственный медицинский университет»

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленного электронного оригинала-макета
в ООО «Ветеран»