ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2019 Випуск 80. С. 170–176
Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2019. Issue 80. P. 170–176

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 316.441:612.273+612.018 https://doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.18

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ СПОНТАННО-ГІПЕРТЕНЗИВНИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ НОРМОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ ТА МЕЛАТОНІНУ

Р. Янко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна
e-mail: biolag@ukr.net

Мета нашої роботи полягала в дослідженні поєднаного впливу переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) та мелатоніну на морфологічні зміни щитоподібної залози (ЩЗ) спонтанно-гіпертензивних щурів. Дослідження проведено на 24 спонтанно-гіпертензивних (лінія SHR) щурах-самцях у весняний період року. На кінець експерименту вік тварин становив 4 місяці. Щурів розподілили на 2 групи: I – контрольні тварини, II – щури, які зазнавали поєднаного впливу ПНГ і мелатоніну. Для проведення щоденних сеансів гіпоксичного впливу щурів розміщували в герметичній камері, в яку подавали гіпоксичну газову суміш (12 % кисню в азоті) у переривчастому режимі (15 хвилин деоксигенація / 15 хвилин реоксигенація протягом 2 годин) за допомогою мембранного газорозподільного елементу. Інший час доби (22 години) щури дихали атмосферним повітрям. Піддослідним тваринам також щодня перорально вводили екзогенний мелатонін («Unipharm Inc., США») о 10:00 в дозі 5 мг/кг. Тривалість експерименту становила 28 діб. Із тканини ЩЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. Морфометричні виміри у залозі здійснювали на цифрових зображеннях за допомогою комп'ютерної програми «Image J». Виявлено, що 28-добовий поєднаний вплив ПНГ і мелатоніну зумовлює підвищення функціональної активності ЩЗ спонтанно-гіпертензивних щурів. На це вказує зменшення розмірів фолікулів і колоїду, збільшення кількості тиреоцитів у фолікулі, зростання фолікулярно-колоїдного індексу та зниження індексу накопичення колоїду, зменшення ширини прошарків міжфолікулярної сполучної тканини. Ці дані можуть мати не тільки теоретичне значення, але й становити певний практичний інтерес під час використання гіпоксичних газових сумішей і мелатоніну для підвищення функції щитоподібної залози у осіб, що страждають на артеріальну гіпертензію.

Ключові слова: щитоподібна залоза, переривчаста гіпоксія, мелатонін

Щитоподібна залоза (ЩЗ) регулює обмін речовин, роботу серцево-судинної та нервової системи, фізичний і розумовий розвиток. Якщо в її роботі відбувається збій, то це неодмінно позначається на самопочутті й роботі всього організму. За статистикою Всесвітньої організації охорони здоров'я, серед ендокринних захворювань патологія ЩЗ посідає перше місце [21].

Артеріальна гіпертензія залишається однією з найбільш значущих медичних і соціальних проблем. Це пов'язано як із широким розповсюдженням цієї патології, так і з тим, що підвищений тиск сприяє розвиткові серцево-судинних захворювань, які призводять до високої смертності. У більшості країн світу близько 50 % населення у віці старше 60 років страждають на підвищений артеріальний тиск [16].

© Янко Р., 2019

Взаємозв'язок між ЩЗ і артеріальною гіпертензією дуже тісний. Підвищення артеріального тиску може спостерігатися під впливом тиреоїдних гормонів. Якщо в роботі залози відбуваються порушення, то це часто призводить до розвитку гіпертонії. З іншого боку, за тривалої та стійкої артеріальної гіпертензії у ЩЗ можуть виникати необоротні морфологічні зміни, що призводять до істотного зниження її функціональної активності [17].

У зв'язку з цим зростає актуальність розробки нових ефективних методів профілактики і лікування порушень функцій ЩЗ. Вважають, що одними з таких методів може бути використання переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну.

Переривчасту нормобаричну гіпоксію (ПНГ) широко використовують у сучасній медичній практиці для лікування і профілактики низки захворювань серцево-судинної, дихальної, ендокринної та імунної систем, а також для підвищення фізичної витривалості й адаптаційних можливостей організму [1].

Мелатонін регулює метаболічні, імунні та регенераторні процеси, бере участь у механізмах терморегуляції і старінні. Відомо, що мелатонін реалізує свою дію через інші залози внутрішньої секреції, головним чином через тиреоїдні гормони [18].

Наукові роботи, присвячені впливу ПНГ чи мелатоніну на функціональну активність ЩЗ, нечисленні й часто мають неоднозначні результати [3, 4, 13, 15]. Це може бути пов'язано з використанням в експериментах тварин різних ліній і віку, відмінностями в режимах подачі ПНГ, впливу гіпоксії за умов гіпо- чи нормобарії, дозуванням мелатоніну, сезонністю і тривалістю проведення експериментів тощо. Більшість досліджень, присвячених впливу ПНГ чи мелатоніну на стан ЩЗ, проведено на нормотензивних щурах лінії Вістар [3, 10]. Робіт, у яких би досліджувався поєднаний вплив ПНГ і мелатоніну на стан залози у тварин або людей з артеріальною гіпертензією, нами не знайдено, що дає підстави вважати дослідження у цьому напрямі актуальним.

Мета роботи – дослідити поєднаний вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну на морфологічні зміни щитоподібної залози спонтанно-гіпертензивних щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 24 спонтанно-гіпертензивних (лінія SHR) щурах-самцях у весняний період (квітень) року. На кінець експерименту вік тварин становив 4 місяці. Артеріальний тиск у щурів визначали в умовах віварію неінвазивним методом на хвостовій артерії. Усі вимірювання проводили за допомогою сфігмоманометра (S-2 «SHE» Німеччина). В експеримент брали щурів зі систолічним тиском не нижче 145 мм рт. ст.

Щурів розподілили на 2 групи: I – контрольні тварини, II – щури, які зазнавали поєднаного впливу ПНГ і мелатоніну. Тварини обох груп перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування. Для проведення щоденних сеансів гіпоксичного впливу щурів розміщували в герметичній камері, в яку подавали гіпоксичну газову суміш (12 % кисню в азоті) у переривчастому режимі (15 хв деоксигенація / 15 хв реоксигенація протягом 2 год) за допомогою мембранного газорозподільного елементу. Інший час доби (22 год) щури дихали атмосферним повітрям. Піддослідним тваринам вводили також щодня перорально екзогенний мелатонін («Unipharm Inc., США») о 10:00 в дозі 5 мг/кг. Загальна тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Дослідження проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

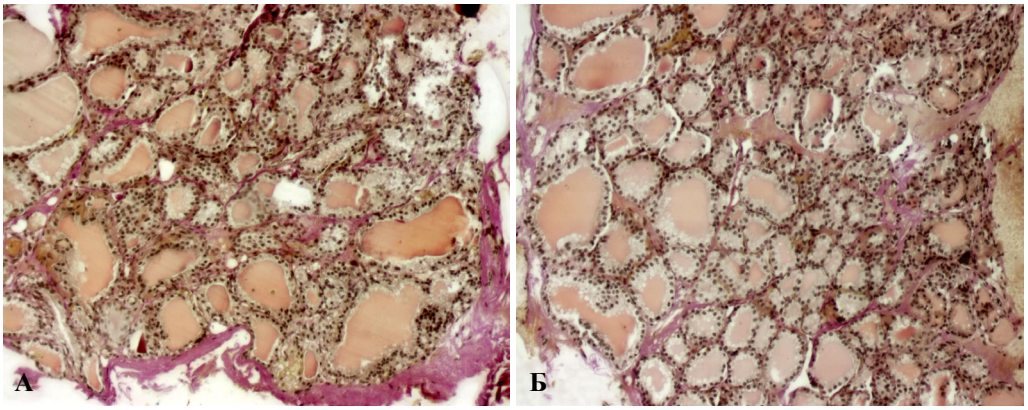
Із тканини ЩЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності (від 70 до 96°) та діокса-

ні. Отримані зразки заливали в парафін. Парафінові зрізи завтовшки 5–6 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксиліном Бемера й еозином. Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували методи дво- і трикольорового забарвлення за Ван-Гізоном і Массоном [5]. Використовуючи цифрову камеру, мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nicon» (Японія). Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Image J». На гістологічних зрізах ЩЗ вимірювали площу поперечного перерізу фолікулів, колоїду й фолікулярного епітелію, визначали зовнішній і внутрішній діаметри фолікулів, вимірювали висоту фолікулярного епітелію та ширину прошарків міжчасткової, міжчасточкової і міжфолікулярної сполучної тканини, підраховували кількість тиреоцитів у фолікулі. Визначали фолікулярно-колоїдний індекс та індекс накопичення колоїду [8].

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0. Нормальність розподілу цифрових масивів перевіряли за критерієм Пірсона. За нормального розподілу, для оцінки достовірності різниці між контрольними і дослідними групами використовували t-критерій Стьюдента. Зміни вважали вірогідними за $P<0,05$.

Результати і їхнє обговорення

ЩЗ щурів після поєднаного впливу ПНГ і мелатоніну має збережену структуру, з чітким розподілом на центральну та периферичну зони. Фолікули в ЩЗ овальної та видовженої форми, різного розміру. Фолікули дрібного та середнього розміру локалізуються в центральній частині залози, а великого розміру – по периферії. У ЩЗ інтактних тварин колоїд у фолікулах має рівномірне рожеве забарвлення, помірної чи щільної консистенції з резорбційними вакуолями. Колоїд фолікулів дослідних тварин помірної щільності, рідше пінистий із численними резорбційними вакуолями, що свідчить про вивільнення гормонів (див. рисунок).



Мікрофотографії щитоподібної залози контрольних тварин (А) та щурів, які зазнавали поєднаного впливу переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну (Б). Забарвлення за методом Ван-Гізон. Збільшення 200

У ЩЗ тварин, які зазнавали поєднаного впливу ПНГ і мелатоніну, спостерігали вірогідне зниження площі поперечного перерізу фолікулів і колоїду на 12 і 15 % відповідно, порівняно з контролем, тоді як площа фолікулярного епітелію мала тенденцію лише до зниження. Внутрішній діаметр фолікулів у ЩЗ дослідних щурів мав тенденцію до зменшення на 8 %, порівняно з контрольним показником (див. таблицю). Зниження розмірів фолікулів і колоїду може вказувати на зростання активності ЩЗ, в першу чергу, пов'язане з вивільненням гормонів у кровоносне русло. У малоактивному стані ЩЗ складають фо-

лікули переважно великого розміру, за рахунок депонування гормонів усередині фолікула, збільшення об'єму колоїду [8].

Морфометричні показники щитоподібної залози щурів (M±m, n=12)

Показники	Контроль	Дослід
Площа, мкм^2		
фолікула	2793±85	2462±93*
колоїду	1362±86	1161±80*
фолікулярного епітелію	1431±109	1301±99
Діаметр фолікула, мкм		
зовнішній	59,0±2,87	56,4±1,38
внутрішній	41,6±2,54	38,2±1,22
Висота тиреоцитів, мкм	8,7±0,30	9,1±0,52
Кількість тиреоцитів у фолікулі, шт.	19,9±0,28	22,6±0,42*
Фолікулярно-колоїдний індекс, од.	1,05±0,08	1,12±0,04
Індекс накопичення колоїду, од.	2,28±0,14	2,1±0,13
Ширина прошарків сполучної тканини, мкм		
міжчасткова	33,1±1,81	36,0±2,71
міжчасточкова	10,6±0,65	10,2±0,91
міжфолікулярна	2,3±0,16	1,6±0,12*

Примітка: * — вірогідна різниця з контролем (P<0,05)

Тиреоцити дослідних щурів мали кубічну, рідше призматичну форму. Середня кількість тиреоцитів у фолікулі вірогідно зросла на 14 %, висота – мала тенденцію до збільшення порівняно з контрольними показниками (див. таблицю).

Фолікулярно-колоїдний індекс (відношення площі поперечного перерізу фолікулярного епітелію до площі колоїду) у дослідних щурів був більшим на 7 % порівняно з контрольним показником, тоді як індекс накопичення колоїду (відношення внутрішнього діаметра фолікула до подвійної висоти фолікулярного епітелію), навпаки, був меншим на 8 %, ніж у контролі (див. таблицю). Зростання фолікулярно-колоїдного індексу та зниження індексу накопичення колоїду є ознакою посилення секреції тиреоїдних гормонів у кровоносне русло [7].

До складу сполучнотканинного остова залози входять капсула і строма. В останній розрізняють міжчасткову, міжчасточкову, міжфолікулярну і паравазальну сполучну тканину (СТ). Міжчасткова СТ оточує частку залози зовні. Міжчасточкова СТ розділяє паренхіму ЩЗ на часточки. До її складу входять тонкі пучки колагенових волокон, які переплітаються в різних напрямках. Міжфолікулярна СТ складається з ретикулярних і колагенових волокон, які вплітаються у фолікулярні оболонки, зв'язуючи фолікули між собою. Паравазальна СТ оточує судини залози. Вона представлена переважно еластиновими, меншою мірою – колагеновими волокнами [19].

Виявлено, що у ЩЗ тварин після сумісного впливу ПНГ і мелатоніну ширина прошарків міжфолікулярної СТ була вірогідно меншою від контролю на 30 %. Це може свідчити про відносне зменшення маси СТ між фолікулами залози, що, у свою чергу, покращує міжфолікулярний обмін речовин і проникнення гормонів через гісто-гематичний бар'єр у кров. Ширина прошарків міжчасткової і міжчасточкової СТ залишалася близькою до контрольних показників (див. таблицю).

Раніше нами були проведені експерименти з дослідження реакції ЩЗ щурів (такого ж віку та лінії) після роздільного впливу ПНГ і мелатоніну. Було виявлено, що як ПНГ, так і мелатонін (більшою мірою) позитивно впливали на морфофункціональний стан ЩЗ. Про це свідчило зниження розмірів фолікулів, зростання висоти тиреоїдного епітелію, збільшення фолікулярно-колоїдного індексу, зниження індексу накопичення колоїду та ширини прошарків сполучної тканини в залозі піддослідних тварин [2, 9].

В інших дослідженнях нами було вивчено вплив поєднаного впливу ПНГ і мелатоніну на морфологічні зміни ЩЗ нормотензивних щурів лінії Вістар. Було показано, що за такого впливу у щурів даної лінії також з'являються морфологічні ознаки підвищення активності залози [10].

Більшість авторів досліджували вплив гіпоксичних газових сумішей на стан ЩЗ в умовах гіпобарії. Так, виявлено, що в умовах середньогір'я активність залози зростає, а на великих висотах – пригнічується [3, 20]. Показано, що у процесі адаптації до умов високогір'я (3200 м н.р.м.) розвивалися фазні зміни функціональної активності ЩЗ. На першому (ранньому) етапі високогірної адаптації (1–7 днів) відбувалося підвищення гормональної активності, а на другому (30–60 днів) – нормалізація і гальмування активності залози [6]. Деякі дослідники відзначали позитивний ефект нормобаричних гіпоксичних газових сумішей на функціональний стан залози. Так, Y. Ma і співавт. виявили, що вплив дозованої гіпоксії (5 % O_2) посилював синтез гіпоксіє-індуцибельного фактора, який стимулював синтез тиреоїдних гормонів [15]. Показано підвищення експресії маркерів транскрипції тиреоїдних гормонів і зростання диференціації залози за гіпоксії [22].

У більшості публікацій показано пригнічувальний ефект мелатоніну на активність залози, що проявлявся у зниженні концентрації тиреоїдних гормонів у сироватці крові [11, 13]. Однак у частині робіт опубліковано дані про стимулювальний ефект мелатоніну на ЩЗ [4, 12]. Виявлено, що ін'єкції мелатоніну (протягом 10 діб) в дозі 0,05 і 0,5 мг/кг підвищували секрецію тиреоїдних гормонів у щурів. При цьому збільшувалася відносна кількість тиреоцитів із диплоїдними ядрами, що можна розцінювати як «омолодження» ЩЗ. Інша група вчених спостерігала гіпофункцію ЩЗ після перебування кроликів в умовах цілодобового освітлення, яке пригнічує синтез мелатоніну. А після введення екзогенного мелатоніну або забезпечення тваринам умов природного світлового циклу функція залози поверталася до норми [12]. Dzerzhynsky і співавт. показали, що мелатонін покращує синтетичну активність залози [14].

Таким чином, нами виявлено, що поєднаний вплив ПНГ і мелатоніну більшою мірою посилює активність ЩЗ спонтанно-гіпертензивних щурів, ніж дія досліджуваних факторів поодинці.

Отже, за 28-добового поєднаного впливу переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну виявляються морфологічні ознаки підвищення функціональної активності щитоподібної залози спонтанно-гіпертензивних щурів. На це вказують зменшення розмірів фолікулів і колоїду, збільшення кількості тиреоцитів у фолікулі, зростання фолікулярно-колоїдного індексу та зниження індексу накопичення колоїду, зменшення ширини прошарків міжфолікулярної сполучної тканини. Ці дані можуть не тільки мати теоретичне значення, але й становити певний практичний інтерес під час використання гіпоксичних газових сумішей і мелатоніну для підвищення функції щитоподібної залози у осіб, що страждають на артеріальну гіпертензію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Березовский В. А.* Природная и инструментальная оротерапия. Донецк: Заславский А. Ю., 2012. 306 с.
2. *Березовский В. А., Янко Р. В., Левашов М. И.* и др. Сезонные различия влияния мелатонина на морфофункциональное состояние щитовидной железы спонтанно-гипертензивных крыс // Рос. физиол. журнал им. М.И. Сеченова. 2016. Т. 102. № 5. С. 575–583.

3. *Васильева Е. В., Тараракк Т. Я., Васильева Н. А., Балыкин Н. В.* Влияние прерывистой гипобарической гипоксии на морфофункциональные изменения щитовидной железы // Вестн. ТвГУ. Сер. биол. и экол. 2008. № 8. С. 8–13.
4. *Геворкян А. Р., Губина-Вакулик Г. И., Бондаренко Л. А.* Морфофункциональные изменения щитовидной железы старых крыс после курсового введения мелатонина в зависимости от времени суток // Проблемы эндокринной патологии. 2009. № 4. С. 103–11.
5. *Данилов Р. К.* Руководство по гистологии. Т. 2. СПб.: СпецЛит., 2011. 513 с.
6. *Калюжная Л. И.* Эндокринные механизмы адаптации организма к условиям высокогорья. Гипоксия. Адаптация. Патогенез. Клиника / под ред. Ю. Л. Шевченко. СПб., 2000. С. 235–265.
7. *Кубарко А. И., Yamashita S., Денисов С. Д.* и др. Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты. Минск; Нагасаки: Hashim., 1998. 368 с.
8. *Никишин Д. В.* Морфология и методы исследования щитовидной железы: метод. рекомендации. Пенза: Инф.- изд. центр ПГУ, 2008. 64 с.
9. *Янко Р. В.* Морфологічні відмінності щитоподібної залози спонтанно гіпертензивних щурів після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії в різні сезони року // Ендокринологія. 2017. Т. 22. № 3. С. 273–278.
10. *Янко Р. В., Березовский В. А., Литовка И. Г., Жерноклёв У. А.* Влияние дозированной нормобарической гипоксии и мелатонина на морфофункциональное состояние щитовидной железы // Проблеми ендокринної патології. 2018. № 1. С. 71–77.
11. *Baltaci A. K., Mogulkoc R., Kul A.* et al. Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats // Toxicol. 2004. Vol. 195. N 1. P. 69–75.
12. *Bondarenko L. A., Sotnik N. N., Chagovets E. M.* et al. Intensity of *in vitro* incorporation of 3H-melatonin in the thyroid gland of rabbits with pineal gland hypofunction // Bull. Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 150. N 6. P. 753–755.
13. *Champney T. H.* Reductions in hamster serum thyroxine levels by melatonin are not altered by changes in serum testosterone // Gen.Comp.Endocrinol. 2001. Vol. 123. N 2. P. 121–126.
14. *Dzerzhynsky M. E., Gorelikova O. I., Pustovalov A. S.* The interaction of the thyroid gland, pineal gland and immune system in chicken // Reprod Biol. 2006. Vol. 6. N 2. P. 79–85.
15. *Ma Y., Freitag P., Zhou J.* et al. Thyroid hormone induces erythropoietin gene expression through augmented accumulation of hypoxia-inducible factor-1a // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. Vol. 287. N 3. P. 600–607.
16. *Madhur M. S., Maron D. J.* Hypertension treatment & management // Medscape [serial online]. Sep 30. 2014. Available at http://www. medicine.medscape.com/article/241381.
17. *Mazza A., Beltramello G., Armigliato M.* et al. Arterial hypertension and thyroid disorders: what is important to know in clinical practice? // Ann Endocrinol (Paris). 2011. Vol. 72. N 4. P. 296–303. doi: 10.1016/j.ando.2011.05.004.
18. *Lewinski A., Karbownik M.* REVIEW. Melatonin and the thyroid gland // Neuro Endocrinol Lett. 2002. Vol. 23. N 1. P. 73–78.
19. *Ludwig K. S.* Structure of the thyroid gland; I. Structure of connective tissue // Acta Anat (Basel). 1952. Vol. 15. N 3. P. 300–308.
20. *Sawhney R. C., Malhotra A. S.* Thyroid function during intermittent exposure to hypobaric hypoxia // Int. J. Biometeorol. 2010. Vol. 34. N 3. P. 161–163.
21. *Vanderpump M. P.* The epidemiology of thyroid disease // Br. Med. Bull. 2011 Vol. 99. P. 39–51. doi: 10.1093/bmb/ldr030.
22. *Yang Y., Lu Y., Chen T.* et al. Hypoxia promotes thyroid differentiation of native murine induced pluripotent stem cells // Int. J. Dev. Biol. 2016. Vol. 60. N 4–6. P. 85–93. doi: 10.1387/ijdb.160083yy.

ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2019. Випуск 80

Стаття: надійшла до редакції 31.01.19

доопрацьована 06.03.19

прийнята до друку 12.03.19

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE THYROID GLAND OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS AFTER THE EFFECT OF INTERMITTENT NORMOBARIC HYPOXIA AND MELATONIN

R. Yanko

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine
4, Bogomoletz St., Kyiv 01024, Ukraine
e-mail: biolag@ukr.net

The purpose of our work was to study the combined effects of intermittent normobaric hypoxia (INH) and melatonin on morphological changes of the thyroid gland of spontaneously hypertensive rats. The study was conducted on 24 spontaneously hypertensive (SHR lines) male rats in the spring period of the year. At the end of the experiment, the age of the animals was 4 months. Blood pressure in rats was determined at the caudal artery using a sphygmomanometer (S-2 "SHE" Germany). The rats were divided into 2 groups: I – control animals, and II – rats exposed to combined INH and melatonin. The experimental animals were daily given a hypoxic gas mixture (12 % O_2) in intermittent mode: 15 min deoxygenation/15 min reoxygenation during 2 hours. Another time of day (22 hours) the rats breathed air. Melatonin ("Unipharm Inc., USA") was daily administered orally in a dose of 5 mg/kg at 10.00 a.m. The total duration of the experiment was 28 days. Histological preparations were prepared according to a standard methodic. Histomorphometry of the digital images of preparations was carried out using the computer program «Image J». It was found that 28-day combined effect of INH and melatonin has morphological signs of increasing the functional activity of the thyroid of spontaneously hypertensive rats. This is indicated by a decrease in the size of the follicles and colloid, an increase in the number of thyroid cells in the follicle, an increase in the follicular-colloidal index and a decrease in the colloid accumulation index, and a decrease in the width of the interfollicular connective tissue layers. These data may have not only a theoretical value, but also some practical interest in the use of hypoxic gas mixtures and melatonin to enhance the function of the thyroid gland in people suffering from arterial hypertension.

Keywords: thyroid gland, intermittent hypoxia, melatonin