

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»

На правах рукописи

ЗИМА ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**СТРЕСС И НАРУШЕНИЕ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ  
АПОПТОЗА В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

3.1.9. Хирургия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Зяблицкая Евгения Юрьевна

доктор мед. наук, доцент;

Безруков Олег Филиппович

доктор мед. наук, доцент.

Симферополь, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
1.1. Роль стресса в механизмах развития заболеваний щитовидной железы, актуальные данные для его моделирования и оценки .....	16
1.2. Существующие диагностические алгоритмы и подходы при заболеваниях щитовидной железы, их преимущества и недостатки .....	26
1.3. Молекулярные маркеры в диагностике тиреоидной патологии .....	35
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	45
2.1. Дизайн исследования .....	45
2.2. Эксперимент по изучению роли стресса в развитии патологии щитовидной железы и использованные морфологические и физиологические методы .....	47
2.3. Методы клинических диагностических исследований пациентов .....	57
2.4. Метод ретроспективного анализа и исследуемые параметры .....	61
2.5. Методы математико-статистической обработки результатов.....	62
<b>ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АДАПТАЦИОННЫХ СИСТЕМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА</b> ....	64
3.1. Динамика функциональных показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем .....	64
3.2. Динамика гематологических показателей .....	79
<b>ГЛАВА 4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА</b> .....	90
4.1. Изменение уровня гормонов щитовидной железы и надпочечных желез в сыворотке крови .....	90
4.2. Структурные изменения щитовидной железы .....	93
4.3. Иммунофенотипические изменения щитовидной железы .....	107
<b>ГЛАВА 5. ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЕЕ ПАТОЛОГИИ</b> .....	116

<b>ГЛАВА 6. ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ.....</b>	<b>128</b>
<b>ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>140</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>148</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>150</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>151</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>152</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Актуальность исследования связана с высокой заболеваемостью хирургической патологией щитовидной железы, прогрессирующей в 2020-2022 годах в связи с пандемией COVID-19, патогенетически вызывающей дисфункцию эндокринной системы, а также в связи с ростом стрессового воздействия на человека. Актуальность обусловлена и существенной долей рака щитовидной железы среди узловых образований и объективными трудностями их предоперационной дифференциальной диагностики [1-7]. Наследие аварии на Чернобыльской атомной электростанции, вероятность техногенных катастроф и дестабилизация ядерной энергетической отрасли в мире в XXI веке также потенцируют высокий риск роста злокачественных новообразований (ЗНО) [8-9]. Меняющиеся условия внешней среды и возрастающая интенсивность ее патогенного действия вызывают патоморфоз узловых образований щитовидной железы и требуют совершенствования подходов к их диагностике [10-11].

По данным Global Cancer Statistics 2020 число новых случаев рака щитовидной железы (C73 по МКБ-10) составляет 3% среди 36 локализаций ЗНО и находится на 11-м месте по частоте, при этом рак щитовидной железы – самая распространенная злокачественная опухоль эндокринной системы [12]. В России за 2021 год структура заболеваемости ЗНО схожа с общемировой [13]. Важно отметить, что число пациентов, требующих дифференциальной диагностики узловых образований, превышает цифры заболеваемости раком в 10-15 и более раз. А относительно невысокая смертность (0,4% от всех летальных случаев, связанных с раком) показывает перспективность своевременной диагностики и лечения больных с данной локализацией рака [12]. Важно отметить, что у всех россиян, заболевших ЗНО в возрасте до 30 лет, рак щитовидной железы занимает третье место и составляет уже 8,3% в общей структуре онкопатологии, а среди женской популяции – 12,0%.

Темп прироста заболеваемости раком щитовидной железы превосходит все другие локализации и вызывает наибольшие опасения в России и в мире. За последние 10 лет среди россиян заболеваемость выросла от показателя 6,26 до 9,80 со среднегодовым темпом прироста 3,54% и с приростом за 10 лет на 43,97%. У мужчин эти показатели еще более драматичны: 4,62 % в год и 61,99% за 10 лет. За 2010-2020 гг. наблюдается значимый прирост показателя заболеваемости злокачественными новообразованиями щитовидной железы и среди детей до 15 лет (на 49,6%). Общемировые тенденции аналогичны [13].

**Степень разработанности научной темы исследования.** Опыт нашей работы в клинике эндокринной хирургии показал существенную роль стресса как пускового фактора развития аутоиммунных и неопластических заболеваний щитовидной железы с преобладанием данного механизма у женщин репродуктивного возраста [14]. Большой научный теоретический и практический интерес в этих процессах представляют молекулы-регуляторы клеточного цикла: как маркеры патогенетических изменений при стрессе и диагностические показатели при иммуноморфологических исследованиях, демонстрирующие злокачественные перестройки вектора клеточного обновления [15]. Изучению роли стресса в возникновении тиреоидной патологии посвящено много работ, демонстрирующих комбинированное и изолированное воздействие стрессоров разной природы [16-26]. Показаны многочисленные функциональные и морфологические изменения фолликулярного компартмента и интерфолликулярных структур при стрессе, имеющие тяжелые последствия, включая развитие аутоиммунной патологии и рака [9]. Изменения в клетке при раке и стрессе связаны с динамикой экспрессии рецепторов апоптоза *CD95 (FAS-R)*, обеспечивающих элиминацию раковых клеток [15]. Многие факторы патогенеза рака щитовидной железы вызывают накопление избытка активных форм кислорода (АФК), что приводит к окислительному стрессу, который может инициировать и поддерживать повреждения ДНК. Щитовидная железа является специфическим органом влияния АФК на нестабильность генома, так как сложный механизм биосинтеза тиреоидных гормонов требует присутствия  $H_2O_2$  в

норме. При этом окислительный стресс и повреждение ДНК являются событиями, предшествующими онкотрансформации тироцитов и поддерживают онкогенез [27]. Несмотря на обилие публикаций, мы не нашли систематизированных данных, обобщающих роль стресса в инициации заболеваний щитовидной железы. Особенности морфологических и функциональных перестроек щитовидной железы при различных видах стресса мало детализированы в зависимости от пола и возраста, динамики клеточных популяций, экспрессии белковых маркеров функционального состояния клеток. Эти данные могут способствовать улучшению существующих диагностических алгоритмов.

Стандартная дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы в настоящее время базируется на анализе результатов ультразвукового исследования, статуса тиреотропных и тиреоидных гормонов, кальцитонина, а также заключении цитологического исследования материала тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ), которой принадлежит решающая роль при постановке диагноза [28]. Такой подход позволяет классифицировать выявленные изменения в диагностические группы (6 категорий по Bethesda), определяющие последующую терапевтическую тактику и/или объем оперативного вмешательства: консервативное ведение и активное клиническое наблюдение, тотальная тиреоидэктомия или гемитиреоидэктомия [28, 29]. И этот общепринятый алгоритм в большинстве случаев является точным, однако у ряда пациентов он не удовлетворяет потребностям диагностического процесса в связи с наличием клинических случаев, когда цитологических признаков недостаточно для дифференциации доброкачественных и злокачественных опухолей. В соответствии с клиническими рекомендациями, большинство пациентов с неопределенным цитологическим заключением, в том числе относящимся к категории Bethesda III и IV, направляются на операцию. При этом послеоперационное гистологическое исследование не всегда подтверждает злокачественную природу узлов в удаленной железе. Связано это с тем, что тироциты доброкачественных фолликулярных неоплазий по морфологическим характеристикам неотличимы от клеток фолликулярной карциномы и под

понятием «фолликулярная опухоль» объединяются все узловые образования, характеризующиеся наличием в пунктате клеток фолликулярного эпителия с «сомнительной» атипией. А при папиллярной или медуллярной карциномах в цитологическом материале не всегда визуализируются клетки с достоверными ядерными изменениями [30-33]. В связи с этим на этапе дооперационного типирования патологии щитовидной железы актуален поиск биомаркеров и использование молекулярной диагностики. Например, папиллярные микрокарциномы ранее считались опухолями с медленной прогрессией, однако часть из них проявляет агрессивность, ассоциированную с BRAF V600E мутацией, вызывающей чрезмерную пролиферацию клеток и трансформацию в агрессивную недифференцированную форму, что требует радикальной терапии, а не наблюдения [34]. Таким образом, молекулярное тестирование может помочь в принятии верных тактических решений и идентифицировать узловые образования с высоким риском. Мы считаем, что иммуноцитохимия (ИЦХ) и иммуногистохимия (ИГХ) на клеточном блоке является перспективным методом в спорных случаях дифференциальной диагностики рака щитовидной железы и для оценки потенциала злокачественности на дооперационном этапе.

Остаются неустановленными механизмы канцерогенеза неоплазий щитовидной железы, в том числе папиллярного рака. До настоящего времени нет ответа на вопрос: почему клетки опухоли, которые на протяжении многих десятилетий находились в ткани щитовидной железы, не проявляя биологической активности, так называемые «окультированные раки», активируются, и карцинома переходит в клинически проявленную форму. В связи с относительно благоприятным течением онкопроцесса в щитовидной железе среди хирургов сформировались полярные точки зрения на объем оперативного вмешательства при ранних стадиях папиллярной карциномы. Правильный выбор объема хирургического вмешательства приобретает особенное значение, поскольку после внедрения в клиническую практику ТАПБ с цитологическим исследованием биоптата все большее количество больных с ранними стадиями папиллярного рака подвергаются оперативному лечению. Ряд хирургов считают операцией

выбора при папиллярном раке щитовидной железы тотальную тиреоидэктомию, другие же считают возможным оставлять интактную долю в случае небольшого инкапсулированного рака [35-37].

Таким образом, остается актуальным поиск как ключевых точек злокачественной трансформации тиреоидного эпителия (в том числе и при длительном или интенсивном стрессовом воздействии), так и доступных методик объективизации их диагностики [38-39].

**Цель исследования** – установить роль стресса и нарушений сигнального пути регуляции апоптоза в развитии патологии щитовидной железы и разработать подходы к совершенствованию предоперационной диагностики для выбора хирургической тактики.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить функциональные и морфологические изменения щитовидной железы на экспериментальной модели стресса и определить механизмы его пусковой роли в развитии тиреоидной патологии.

2. Выявить особенности экспрессии маркеров клеточного цикла: апоптоза FAS-R и пролиферации Ki-67 в тироцитах лабораторных белых крыс на модели стресса в эксперименте.

3. Изучить уровень экспрессии маркеров клеточного цикла: апоптоза FAS-R, антиапоптотического bcl2, маркера повреждения генома p53 и пролиферации Ki-67 в тироцитах у пациентов в зависимости от вида патологии щитовидной железы.

4. Разработать подходы к совершенствованию диагностики узловых образований щитовидной железы с использованием иммуноморфологических и молекулярно-генетических методик для выбора хирургической тактики.

5. Провести ретроспективный анализ эффективности разработанного алгоритма диагностики узловых образований щитовидной железы и изменений заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в 2019-2022 годах.



**Научная новизна исследования.** Впервые по комбинации различных патофизиологических, гистологических и клинических параметров комплексно проанализированы изменения в ткани щитовидной железы в условиях изолированного и комбинированного стресса различной продолжительности. Экспериментальным путем определены закономерные изменения клеточного и гормонального гомеостаза, а также структуры фолликулярного эпителия и особенности динамики факторов, определяющих клеточный цикл или готовность тироцита к апоптозу. Впервые изучен уровень экспрессии маркеров клеточного цикла: апоптоза *FAS-R*, антиапоптотического *bcl2*, маркера повреждения генома *p53* и пролиферации *Ki-67* в тироцитах у пациентов в зависимости от вида патологии щитовидной железы и установлена патогенетическая роль стресса и нарушения сигнального пути регуляции апоптоза в механизмах развития заболеваний щитовидной железы на основании общности молекулярных изменений в эксперименте и клинике.

Впервые установлено, что при воздействии на организм комбинированного стресса возникают закономерные изменения в экспрессии *FAS-R* на мембране тироцита. Разработан иммуноцитохимический индекс расчета изменения кинетики клетки.

Разработаны рекомендации по диагностике рака щитовидной железы на основании малоинвазивной методики тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ), с проведением комплекса молекулярно-генетических методов исследований полученного аспирата и на клеточном блоке. Предложен алгоритм динамического наблюдения больных с новообразованиями щитовидной железы неопределенного или неизвестного характера (МКБ 10).

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Определена ведущая роль стресса, как основного инициирующего фактора в развитии тиреоидной патологии и половой диморфизм исследуемых параметров, чем могут быть обусловлены различия заболеваемости у мужчин и женщин. На основании комплексного патофизиологического исследования установлена роль стресса в развитии тиреоидной патологии. Разработан диагностический алгоритм,

ориентированный на данные традиционной ТАПБ узлов щитовидной железы, на основании которого оптимизирован выбор врачебной тактики ведения пациентов с заболеваниями щитовидной железы. Полученные результаты внедрены в клиническую хирургическую диагностическую практику и могут служить основой для дальнейшего изучения, разработки методов профилактики и комплексной терапии патологии щитовидной железы.

*Объект исследования* – патогенетические механизмы аутоиммунных и неопластических заболеваний человека и млекопитающих животных.

*Предмет исследования* – физиологические и морфологические показатели адаптационных систем, тканей и клеток щитовидной железы лабораторных белых крыс при моделировании стресса, а также человека при заболеваниях щитовидной железы.

**Материал и методы исследования.** Работа имеет клинико-экспериментальный характер.

В экспериментальной части работы использованы методы:

1. Моделирование стресса у самцов и самок лабораторных белых крыс – для создания рабочей модели.
2. Физиологические методы: определение показателей крови, кардио-респираторной регуляции, уровня гормонов – для изучения адаптационных систем и подтверждения стрессового воздействия.
3. Морфологические методы изучения щитовидной железы на органном и тканевом уровне – для оценки изменений структуры железы; ИГХ метод (определение экспрессии тироцитами маркеров *FAS-R*, *KI-67*) – для количественной оценки изменений клеточного цикла.

Для исследований пациентов использованы:

1. Общие клинические методы в рамках диагностической работы: сбор анамнеза, осмотр, физикальные методы, УЗИ-диагностика с ТАПБ, определение уровня гормонов щитовидной железы в сыворотке крови.
2. Морфологические методы для верификации диагноза: цитологическая оценка пунктата и гистологическое исследование операционного материала; ИГХ

оценка экспрессии маркеров клеточного цикла *FAS-R*, *bcl 2*, *p 53*, *Ki-67*, при показаниях – исследование мутаций *BRAF V600E* методом ПЦР.

3. Ретроспективный анализ результатов диагностики на предоперационном и постоперационном этапах за период 3,5 года.

В эксперименте и клинике использованы методы световой микроскопии, микросъемки и сканирования гистопрепаратов, морфометрия изображений.

Для обработки цифровых показателей использованы статистические методы: определение средних величин и их производных, корреляционный анализ для межгруппового сравнения и оценки достоверности отклонений показателей методами параметрической и непараметрической статистики.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Развитие стресса у лабораторных животных, проявляющееся изменением лейкоцитарной формулы крови и соответствующей отрицательной динамикой индекса Гаркави, изменением показателей кардиореспираторной системы, уровня кортизола в крови, сопровождается изменением структуры и функции щитовидной железы: неоднородной или очаговой пролиферацией и дифференцировкой ее ткани, динамикой выработки тироксина и экспрессии маркеров митоза *Ki-67* и апоптоза *FAS-R* в тироцитах. Эти процессы по-разному протекают у самцов и самок и зависят от вида стресса и его длительности.

2. Схожая динамика маркеров клеточного цикла *Ki-67* и *FAS-R*, дополненная исследованием антиапоптотического *bcl-2* и маркера повреждения генома *p53* при различной патологии щитовидной железы показала общность механизмов нарушения клеточного цикла тироцитов человека. Расчет индекса экспрессии молекулярных маркеров митоза и апоптоза по формуле  $Z = FAS-R / (Ki67 + 1)$  с учетом результата исследования ткани на наличие мутации в гене *BRAFV600E*, а также кластерный анализ позволили выявить группы пациентов, где используемые молекулярные методы могут прогнозировать злокачественный потенциал ткани железы. Это позволяет дифференцировать материал по категориям низкого, среднего и высокого риска злокачественной трансформации.

3. Определение индекса злокачественности по результатам комплексного молекулярного исследования позволяет оптимизировать диагностику доброкачественных и злокачественных узловых образований щитовидной железы на предоперационном этапе. Внедрение такого алгоритма показало его эффективность на протяжении 3,5-летнего периода исследования.

**Специальности, которым соответствует диссертационная работа.**

Работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.3 – патологическая физиология (медицинские науки), пунктам 1 и 7 паспорта: 1) исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма, 7) изучение реактивности и резистентности организма, комплекса его видовых, этнических, половых, возрастных, конституциональных, генетических и других индивидуальных особенностей, определяющих характер его реагирования на действие внешних патогенных факторов.

Работа также соответствует паспорту научной специальности 3.1.9 – хирургия, пунктам 1 и 2 паспорта: 1) изучение причин, механизмов развития хирургических заболеваний; 2) разработка и усовершенствование методов диагностики хирургических заболеваний.

**Степень достоверности полученных результатов.** Экспериментальное исследование выполнено на базе вивария и Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология» Института «Таврическая академия» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», оснащенного современным оборудованием и при методическом участии специалистов по работе с лабораторными грызунами на достаточной выборке животных с использованием комплекса валидированных методик.

Для выполнения клинической части работ автор проходил стажировку в Клинике высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета для освоения техники ТАПБ, а для цитологических исследований в Национальном центре Клинической морфологической диагностики (СПб) – ведущих учреждениях данного

направления в России. Морфологические исследования выполнены в Гистологической лаборатории с ИГХ и Лаборатории молекулярной биологии ЦНИЛ Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», имеющих разрешение для данного вида медицинских исследований и при методическом участии специалистов, имеющих большой клинический опыт. Работа с пациентами является профессиональной деятельностью диссертанта по хирургическому лечению эндокринной патологии в Клиническом медицинском многопрофильном центре Святителя Луки ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополя.

О достоверности результатов, обоснованности выводов свидетельствует достаточный объём исследований в эксперименте и в клинике, использованием комплекса актуальных лабораторных методов, а также адекватной математической обработкой и статистическим анализом. О высокой степени достоверности свидетельствует использование метрологически обеспеченных средств измерительной техники и необходимого современного лицензированного оборудования, расходных материалов и реагентов.

**Апробация результатов.** Результаты исследования представлены автором на обсуждение на тематических научных форумах: XXVIII Российский симпозиум по эндокринной хирургии «Калининские чтения», 19-20.10.2018, г. Саранск; «Эстафета вузовской науки-2019» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова МЗ Российской Федерации, 27-28.02.2019, г. Москва; международный симпозиум Innovations in lifesciences, 10–11.10.2019, г. Белгород; научная конференция «Актуальные проблемы морфологии: эмбриональный и репаративный гистогенез, филогистогенез», посвященная 105-летию со дня рождения чл.-корр. АМН СССР проф. А.Г. Кнорре, 19.12.2019, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург; VIII медицинский конгресс «Актуальные вопросы врачебной практики», секция Актуальные вопросы КДЛ, 7-11.09.2021 г., г. Ялта; VIII ежегодная национальная выставка Вузпромэкспо 2021 Научно-образовательный центр «Сириус», 8.12.2021, г. Сочи; IX медицинский конгресс «Актуальные вопросы врачебной практики» секция Актуальные вопросы диагностики

инфекционных и онкологических заболеваний, 06–09.09.2022. г. Ялта; международная научно-практическая конференция «Эксперимент в хирургии и онкологии», 14–16.09.2022, г. Курск; всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные исследования – stopper или driver современной онкологии?», Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения РФ, 20-21.10.2022, г. Ростов-на-Дону.

Данные за три года включены в мультицентрическое исследование TNY-COVID о влиянии пандемии COVID-19 на рак щитовидной железы на базе университета Кальяри (Università degli Studi di Cagliari), Италия, 2022.

**Внедрение результатов работы в практику.** Отдельные положения, вошедшие в диссертационное исследование, внедрены в образовательные программы и используются в учебном процессе студентов, ординаторов, аспирантов кафедры общей и клинической патофизиологии, патологической анатомии, хирургии № 2 Института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Результаты клинической части исследования используются в работе Клинического медицинского многопрофильного центра Святителя Луки ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», ООО «Клиника Генезис» и Центральной научно-исследовательской лаборатории Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского».

**Публикации автора по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, отражающих основные результаты, научные положения и выводы. Из них: 2 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Web of Science, Scopus; 6 статей в специализированных рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Российской Федерации, 9 публикаций в сборниках материалов тематических научных конференций, 1 патент на изобретение РФ.

**Личный вклад автора в исследование.** Автором лично инициировано проведение исследования в связи с его деятельностью врача-хирурга, совместно с

руководителями сформулированы цель и задачи работы, разработан ее дизайн с привлечением необходимого оборудования и лабораторного обеспечения. Автор выполнил все манипуляции и эксперимент на животных, ТАПБ и отработку диагностики с пациентами. В выполнении высокотехнологичных лабораторных методик автор принимал непосредственное участие совместно со специалистами лаборатории и самостоятельно оформил результаты, выполнил анализ полученных данных, биостатистические расчеты и подготовил статьи. Автором сформулированы выводы, разработаны научные и практические рекомендации.

Экспериментальный раздел работы выполнен при поддержке программы развития ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского».

Клинический раздел работы получил поддержку из государственного задания FZEG-2020-0060 «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий», № государственной регистрации АААА-А20-120122490026-1, где автор является исполнителем.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа структурирована классически, содержит введение, обзор литературы, главу о материалах и методах исследования, четыре главы с результатами собственных исследований, главу анализа и обобщения результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 174 наименования работ. Работа изложена на 171 странице машинописного текста, иллюстрирована 19 таблицами, 9 диаграммами, 3 блок-схемами, 68 рисунками (из них 2 иллюстрации-схемы и 66 микрофотографий).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Роль стресса в механизмах развития заболеваний щитовидной железы, актуальные данные для его моделирования и оценки

В XXI веке *проблема стресса* стала крайне актуальной: достигли рекордных цифр темп научно-технического прогресса, информационная и профессиональная нагрузка в связи с цифровизацией всех видов деятельности людей; увеличилась скорость изменений и нестабильность в различных областях жизни, экономические и социальные кризисы спровоцировали военные конфликты, техногенные катастрофы. На биохимическом уровне это приводит к стойкому дисбалансу нейромедиаторов, когда длительно преобладают синтез и эффекты мессенджеров угрозы и вызова (катехоламинов и дофамина), активирующие симпатическую часть вегетативной нервной системы через возбуждение лимбической системы. Продолжительный и интенсивный стресс вызывает перекисные процессы, дезадаптивные эффекты на функциональные цепи регуляции функций, где щитовидная железа играет ведущую роль, реализуя влияние коры мозга, подкорковых структур через нейроэндокринную гипоталамо-гипофизарно-тиреоидную ось и через ТТГ включается в циклы структурной трансформации своей ткани [40-43].

*Гипокинезия* как спутник цивилизационных удобств в условиях стресса способствует усугублению его негативного действия, поскольку работа скелетных мышц является мощным естественным антистрессовым фактором на этапах катаболизма симпатических медиаторов и элиминации веществ. Гипокинезии способствуют техническая автоматизация, чрезмерное использование транспорта, ограничения перемещения по причине травм и болезней, снижение социальной активности в период пандемии и пролонгация дистанционной работы в постпандемический период, чрезмерно долгий рабочий день людей умственного труда. Однако не только работа скелетных мышц является мощным



антистрессором. Не менее актуален для парасимпатического уравнивания полноценный по длительности и структуре своевременный сон. Однако в силу обстоятельств рабочего и личного графика человека, обилия факторов дестабилизации сна и сформировавшихся привычек высокой активности в темное время суток, большинство людей фактически находятся в условиях депривации этого естественного антистрессового фактора. На нейрофизиологическом уровне гормоны активированной щитовидной железы наряду с катехоламинами усугубляют нарушения сна и сдвигают гомеостаз в сторону симпатoadреналового дисбаланса [44-45].

Ряд авторов акцентируют внимание на том, что наряду с гипокинезией и неполноценным сном, мощным стресс-фактором, отрицательно влияющим на организм человека и животных, является *несбалансированное питание*. В результате технологической обработки в пище теряется ряд важных элементов. Доступность и органолептическая притягательность готовых блюд для быстрых перекусов с несбалансированным составом, даже в условиях доступности здоровой пищи, приводит к регулярному выбору в пользу менее полезной еды и нарушениям в нутритивном статусе. Такое питание становится кофактором стресса, потенцирующим метаболическую дезадаптацию [46-47]. Важно отметить, что большинство микроэлементозов связано с дисбалансом йода в связи с недостаточным его поступлением и избытком функционально антагонистических микроэлементов, например брома. В этих условиях поступление йода становится лимитирующим фактором снижения выработки  $T_3$  и  $T_4$ , на что реагирует ТТГ передней доли аденогипофиза, приводящий к структурным перестройкам щитовидной железы, узлообразованию, зобообразованию в случае его длительного воздействия [10, 14].

Согласно теории Ганса Селье, *стресс* – это совокупность неспецифических адаптационных реакций на действие неблагоприятных факторов, нарушающих гомеостаз и состояние жизнеобеспечивающих систем. Выделяют физиологический, психологический и эмоциональный стресс. По этиологии различают нервно-психический, пищевой, иммобилизационный, холодовой и

тепловой, световой, болевой, химический (медикаментозный) и другие виды стресса [21-25].

В исследованиях *влияния стресса на экспериментальных животных* наиболее часто используют модель продолжительной прерывистой иммобилизации лабораторных грызунов, являющуюся стандартизированной с разработанными критериями оценки стадий стресса [44, 45, 48]. Наиболее показательными направлениями, демонстрирующими эффекты стресса в эксперименте, являются изучение: 1) системы крови, 2) поведенческих реакций лабораторных белых крыс, 3) изменений со стороны кардиореспираторного комплекса. Система крови сдвигами лейкоцитарной формулы демонстрирует все стадии стресса по Селье у белых крыс [49, 50]. Этологические исследования позволяют проводить количественный анализ двигательных актов и интерпретировать его с точки зрения преобладания возбуждения и торможения в различных отделах мозга. Анатомо-топографические и функциональные рефлекторные взаимосвязи сердца, легких и малого круга кровообращения, согласованное изменение артериального давления и дыхания, а также физиологическая связь сосудодвигательного и дыхательного бульбарных центров указывают на их комплексные реакции при стрессе, экстремальных и патологических состояниях [41, 45]. Таким образом, эти методики являются оптимальными для валидации экспериментального стресса и определения его стадий у животных.

Попытка *адаптации к хроническому стрессу* в течение длительного времени неизбежно приводит к болезням, поскольку любой стресс активизирует системы физической защиты, агрессии, практически не реализующиеся в условиях гипокинезии и социальных ограничений у человека, и угнетает системы репарации и иммунитет. Иммобилизационный стресс животных как экспериментальная модель гипокинезии человека является сложным по физиолого-биохимическим механизмам, что связано с участием всех систем в реализации стресс-реакции. [50]. Реактивность в ответ на стресс является критерием жизнеспособности животных и человека, она формируется на основе

генетических особенностей и фенотипической изменчивости в ходе индивидуального развития [51]. Она реализуется за счет изменений в первую очередь нейроэндокринных механизмов, эволюционно созданных как краткосрочные реакции, чтобы выиграть время и либо справиться с неблагоприятными условиями, либо уйти из сферы их воздействия – «бей или беги». Тормозящие влияния коры мозга на импульсивное поведение социально необходимо, но оно вынуждает человека длительно находиться под действием стрессоров, что приводит к истощению адаптационных механизмов и развитию патологии.

*Стадийность стресса* и сопутствующих нейроэндокринных процессов коррелируют с уровнем гормонов надпочечных желез и щитовидной железы в их реализации: 1) реакция тревоги, мобилизации адаптационных возможностей как нормальный кратковременный ответ на стресс сопровождается ростом уровня кортизола и  $T_4$  в крови, преобладанием катаболизма; 2) стадия сопротивляемости и долговременной адаптации к продолжающемуся действию стрессора связана с меньшим расходом энергии, однако количество кортизола остается повышенным при снижении  $T_3$  и  $T_4$ ; 3) стадия истощения наступает, если действие повреждающего фактора не закончилось, но адаптивные возможности организма исчерпаны, проявляется снижением уровней, как кортизола, так и  $T_4$ , при повышении концентрации  $T_3$ ; 4) в последующем при успешной адаптации к стрессору или прекращении его действия происходит очень медленная нормализация уровня ключевых гормонов [48, 52, 53].

Так по концентрации гормонов в слюне и крови, можно косвенно судить о стадии адаптации к стрессору и о прогнозах для организма по выходу из состояния хронического стресса. При функционировании вне стрессовых условий гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система работает в физиологическом суточном 24-часовом цикле [53]. Глобальное длительное нарушение циркадных ритмов активности симпатической порции, а также алиментарный хронический дефицит приводят к нарушениям вначале функции, а впоследствии, и структуры щитовидной железы, в первую очередь через

реализацию эффектов ТТГ, вызывающих пролиферацию тироэпителия [59], компенсаторную морфологическую перестройку фолликулярного аппарата щитовидной железы и интерфолликулярных структур [43, 47]. При чрезмерном стрессе меняется высота тироцитов, площадь фолликулов, их ультраструктура и система микроциркуляции железы [54]. Через структурную перестройку и дисбаланс иммунокомпетентных клеток, угнетение продукции гормонов и активацию ТТГ действие стресса на щитовидную железу инициирует развитие ее аутоиммунной патологии [47].

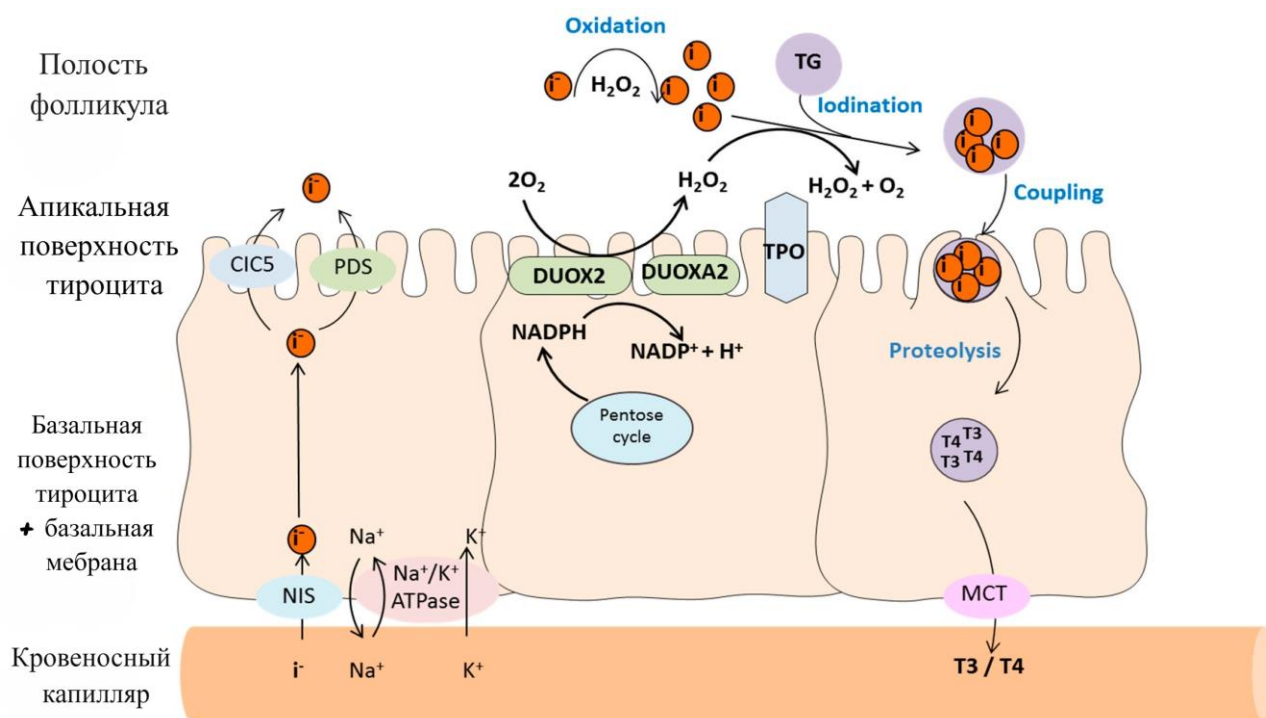
*Гендерный фактор* также определяет реакцию на стресс, которая обуславливает подверженность стрессу, специфическую гендерную уязвимость и стратегии преодоления острого и хронического стресса, что необходимо учесть в эксперименте и находит отражение в структуре заболеваемости в клинике [55, 56]. Так, частота выявления рака щитовидной железы среди женщин в 3 раза выше, чем у мужчин, а смертность отличается не так сильно: 0,5 на 100 000 человек у женщин и 0,3 на 100 000 у мужчин, что свидетельствует о различных преобладающих формах рака в женской и мужской популяции. Высокие показатели заболеваемости наблюдаются в Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии, Восточной Азии и Южной Европе для обоих полов, а также в Южной Америке для женщин. Максимально высокие мировые показатели заболеваемости на Кипре, как для мужчин, так и для женщин. При этом стандартизированный показатель и кумулятивный риск у женщин в три раза выше, чем у мужчин 1,02% и 0,33% соответственно [3, 13, 14]. Мы полагаем, что географическая зависимость заболеваемости обусловлена природными биогеохимическими факторами, радиационным фоном и развитием медицины, определяющим точную диагностику и исключаящим гипердиагностику, что актуально для рака щитовидной железы.

*Этиология* тяжелых повреждений щитовидной железы и рака изучена недостаточно. Единственным хорошо установленным фактором риска рака щитовидной железы является ионизирующее излучение, особенно при воздействии в детском возрасте, хотя есть свидетельства того, что другие факторы

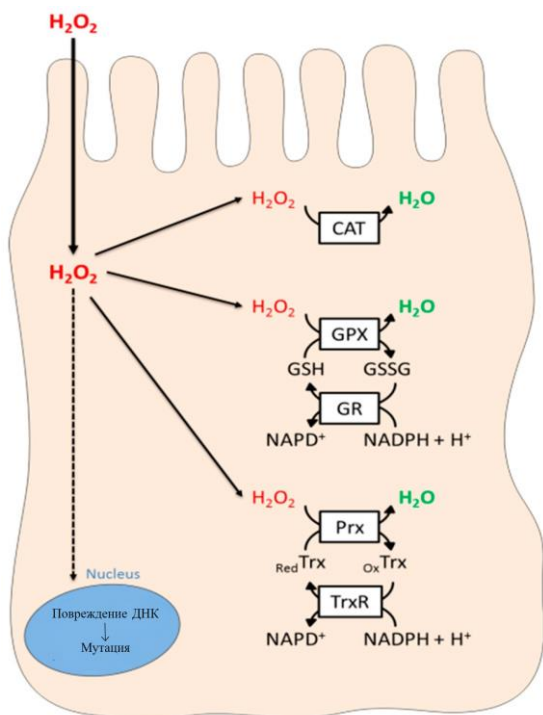
(избыточная масса тела, высокий рост, действие гормонов и загрязнители окружающей среды) также статистически значимы [3]. По-видимому, ключевая роль принадлежит избытку АФК ( $H_2O_2$ ) как мессенджерам, играющим при физиологических концентрациях важную роль в пролиферации эпителия, экспрессии генов, синтезе гормонов, а при патологии инициирующим окислительный стресс, повреждения ДНК и нестабильность генома. При некоторых заболеваниях, включая рак, окислительно-восстановительный баланс в клетке нарушается, что приводит к увеличению внутри- и внеклеточных уровней АФК, вызывающих окислительный стресс, способствующий возникновению опухолей и их прогрессированию в сторону более злокачественных фенотипов через пролиферацию и апоптоз, ангиогенез и инвазию. Показано, что окислительный стресс и повреждение ДНК являются событиями, предшествующими неоплазии в клетках щитовидной железы. Кроме того, окислительные повреждения ДНК выявляются на поздних стадиях рака, что свидетельствует о роли окислительного стресса в поддержании нестабильности генома и прогрессии онкогенеза [58-63].

Основными ферментами, участвующими в окислительно-восстановительных реакциях синтеза гормонов щитовидной железы, являются тиреопероксидаза (ТПО) и ферменты семейства *NADPH-оксидаз (NOX-es)*, называемые двойной оксидазой (*DUOX2*). ТПО катализирует йодирование остатка тиреоглобулина, а оксидазы поставляют  $H_2O_2$ , необходимую в качестве окислителя для работы ТПО и синтеза  $T_3$  и  $T_4$ . Эти ферменты являются важными регуляторами внутриклеточных процессов, а их пространственная и временная активность является условием нормальной работы тироцита (рис. 1) [64]. Пространственный и временной график синтеза гормонов щитовидной железы отражен на рисунке 1А, отражающем и участие пероксида водорода в этих процессах. Рисунок 1В показывает способы избавления клетки от избытка  $H_2O_2$ , что важно для сохранения стабильности ее генома и защиты от онкотрансформации.

A



B



#### А. Ферменты, участвующие в синтезе гормонов:

NIS - симпортер натрия/йодида; PDS - пендрин;  
MCT - переносчики монокарбоксилатов;  
TG - тиреоглобулин; TPO - пероксидаза щитовидной железы; T4 - тетраiodтиронин/L-тироксин; T3 - L-триiodтиронин.

#### В. Антиоксидантные системы выведения $H_2O_2$ из тироцита:

CAT - каталаза;  
GPX - глутатионпероксидаза;  
GR - глутатионредуктаза;  
GSH и GSSG - восстановленные и окисленные формы глутатиона;  
NADP<sup>+</sup> и NADP + H<sup>+</sup> окисленные и восстановленные формы NADP<sup>+</sup>;  
Prx - пероксиредоксин;  
TrxR – тиоредоксин.

Рисунок 1. А. Синтез гормонов щитовидной железы в норме. В. Механизмы выведения  $H_2O_2$ , важные для антимуtagenной защиты [64].

Гормоны  $T_4$  и  $T_3$  синтезируются в составе тиреоспецифического белка тиреоглобулина (TG) и остаются связанными с ним до расщепления и высвобождения в кровотоки (рис. 1). Тиреоглобулин вырабатывается и секретируется тироцитами в просвет фолликула. Синтез  $T_4$  и  $T_3$  требует йодирования остатков тирозина TG, которое происходит в просвете фолликула в многоступенчатом процессе. Йодирование состоит из следующих этапов: 1) окисление йодида, 2) окисление тирозильного радикала, 3) йодирование тиреоглобулина (организация йода) и 4) внутримолекулярное связывание йодтирозинов с образованием  $T_4$  и  $T_3$ . Готовые гормоны высвобождаются в капилляры переносчиками монокарбоксилатов (MCT). Йод транспортируется в тироциты натрий/йодидным симпортером (NIS), расположенным в базальной части их цитоплазматической мембраны. Градиент  $Na^+$ , обеспечивающий энергию для этого транспорта, поддерживается  $Na^+/K^+$ -АТФазой. Затем йод перемещается из цитоплазмы в просвет фолликула с помощью потенциалзависимого хлорного канала *ClC5* и натрий-независимого переносчика хлорида-йодида, пендрина (*PDS*). Концентрированный йодид быстро окисляется ТПО с использованием  $H_2O_2$ , поставляемого *DUOX2* с использованием *NADP* [64].

ТПО представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый на апикальной поверхности тироцитов, и его активность регулируется ТТГ и окисленным йодом [62-63]. Оксидазам требуются факторы созревания для выхода из эндоплазматического ретикулума и достижения плазматической мембраны, где они образуют стабильный комплекс и синтезируют  $H_2O_2$ , которая способствует взаимодействию между оксидазами и ТПО. ТПО регулирует уровень внеклеточной  $H_2O_2$ , ограничивая ее диффузию в клетку, защищая ее ультраструктуры от окислительного повреждения. То есть алиментарный йод, гормоны симпатoadреналовой системы, ферменты и пероксид водорода находятся в тонкой взаимосвязи между собой и пролиферативно активным ТТГ гипофиза. У пациентов с дефектом ТПО чаще выявляются зобобразование и папиллярный рак. В случае фолликулярного рака щитовидной железы есть корреляция высокой

экспрессии ТПО с высокодифференцированным раком, и низкой экспрессии оксидаз 1 и 2 в низкодифференцированных опухолях с мутацией *BRAF* [34, 60-64].

Отдельного упоминания в обзоре заслуживает и роль пандемии *COVID-19* в связи с изменением структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в этот период, отмеченной нами и другими авторами в рамках мультицентрического мирового исследования [65, 66]. Это связано как со специфическими молекулярно-биологическими особенностями коронавируса, так и с неспецифическими факторами: стрессом, терапией глюкокортикоидами и гиподинамией. Среди всех коронавирусов, SARS-CoV-2 на щитовидной железе и гипофизе имеет мишени связывания белка S в виде ACE2 рецепторов, экспрессируемых клетками и других органов человека [66-68]. И участие щитовидной железы в заболевании *COVID-19* и ряде поствакцинальных реакций связывают с огромным набором механизмов: от эффектов стрессового воздействия, до патогенетических механизмов аутоиммунного/воспалительного синдрома, индуцированного адьювантами (синдром ASIA), индукции цитокинов, молекулярной мимикрии и перекрестной реактивностью между некоторыми белками SARS-CoV-2 и различными антигенами человека [69-76]. Показано, что шиповидный белок, нуклеопротеин и мембранный белок SARS-CoV-2 перекрестно реагируют с ТПО из-за сходства и гомологии пептидных последовательностей между этим тиреоидным ферментом и вирусными белками. Следовательно, внутри железы спайковый белок SARS-CoV-2, может вызывать аутоиммунные реакции посредством механизма молекулярной мимикрии и запускать описанные выше ферментативные изменения. Однако это требует индивидуальной предрасположенности, вероятно, генетической природы [70].

Общая схема поражений щитовидной железы при *COVID-19* такая: SARS-CoV-2 заражает системные органы, пептид эпитопа SARS-CoV-2 представлен на поверхности HLA, Т-клетка распознает его, возникают гипервоспалительный синдром и цитокиновый шторм, щитовидная железа повреждается иммунными клетками, тиреоидный аутоантиген попадает в кровоток, который также



представлен на поверхности HLA, развивается АИТ как следствие новой провокации заболевания или активизации ранее существовавшего дремлющего процесса. Выявлена значительная положительная корреляция между сывороточным IL-6 и степенью тиреотоксикоза у пациентов с COVID-19 [70]. Это открытие предполагает, что повышение уровня IL-6 и/или цитотоксических эффектов Т-клеток во время гипервоспалительного синдрома может быть причиной вовлечения щитовидной железы при тиреоидите в период болезни новой коронавирусной инфекцией.

Патоморфологические данные при COVID-19 демонстрируют апоптоз фолликулярных клеток при отсутствии самого вируса в тироцитах [67], что предполагает цитокин-опосредованное поражение щитовидной железы. У большинства пациентов с COVID-19 функция щитовидной железы была нормальной, но у 39% выявлены низкие уровни ТТГ и Т<sub>3</sub>. Патогенез повреждения щитовидной железы при новой коронавирусной инфекции также раскрывает пути ее вовлечения при стрессе: отличается первичный пусковой фактор, но схожи вторичные этапы и ферментные и регуляторные цепи процессов [69-76].

Таким образом, прослеживается прямая связь между внешними стрессорами и развитием молекулярно-биохимических, функциональных и структурных изменений в щитовидной железе, что указывает на ведущую патогенетическую роль адаптационного синдрома. Активное изучение роли стресса в развитии патологии щитовидной железы связано и с общемировым ростом заболеваемости, с пониманием роли железы в реализации стрессовых реакций, а также с прямыми анамнестическими данными конкретных пациентов и связи их заболеваний с травмирующими эпизодами их жизни. Наша гипотеза заключается в том, что стресс запускает молекулярные, клеточные и тканевые реакции фолликулярного аппарата щитовидной железы, ведущие к аутоиммунным и пролиферативным заболеваниям, включающим механизм, индуцированный динамикой синтеза и экспрессии рецепторов-активаторов апоптоза и других регуляторов клеточного цикла. Дальнейшие изменения происходят на фоне нарушенной клеточной кинетики и развиваются по различным направлениям в зависимости от

индивидуальных молекулярных механизмов, склонности к аутоиммунизации. Это определяет возможности и перспективы молекулярной диагностики болезней щитовидной железы.

## **1.2. Существующие диагностические алгоритмы и подходы при заболеваниях щитовидной железы, их преимущества и недостатки**

В настоящее время существуют общепринятые *алгоритмы диагностики* и, соответственно, хирургической тактики ведения больных с узловыми образованиями в щитовидной железе. В целом они должны отражать универсальный пациентоориентированный мультидисциплинарный подход, принятый в онкологической диагностике, когда в работе с пациентом участвуют специалисты разных направлений (рис. 2). Это 1) врачи, владеющие визуализирующими инструментальными методами исследования: рентгенолог, врач УЗИ-диагностики (как правило, хирург, специализирующийся в этом направлении); 2) специалисты соответствующих лабораторий: цитолог, морфолог, врач клинической лабораторной диагностики, молекулярный онкогенетик; 3) основные лечащие врачи: эндокринолог, хирург, онколог, химиотерапевт.

Часто для принятия решений необходимы консилиумы, командная работа таких специалистов, тесно взаимодействующих друг с другом в связи с ограниченностью возможностей каждого отдельного диагностического направления и существенными преимуществами при совместном подходе. Преимущества эти связаны с технической отработкой оптимальных способов взятия материала и соблюдением правил внелабораторного преаналитического этапа, представлением клинических сведений о пациенте, которые чрезвычайно важны для морфологии и большинства лабораторных методик, а также помощь и участие морфологов и врачей-лаборантов в принятии решений на этапах ведения пациента [28, 77-80]. В этом случае хирург и онколог получают преимущества в совместной работе, что, несомненно, полезно пациенту.

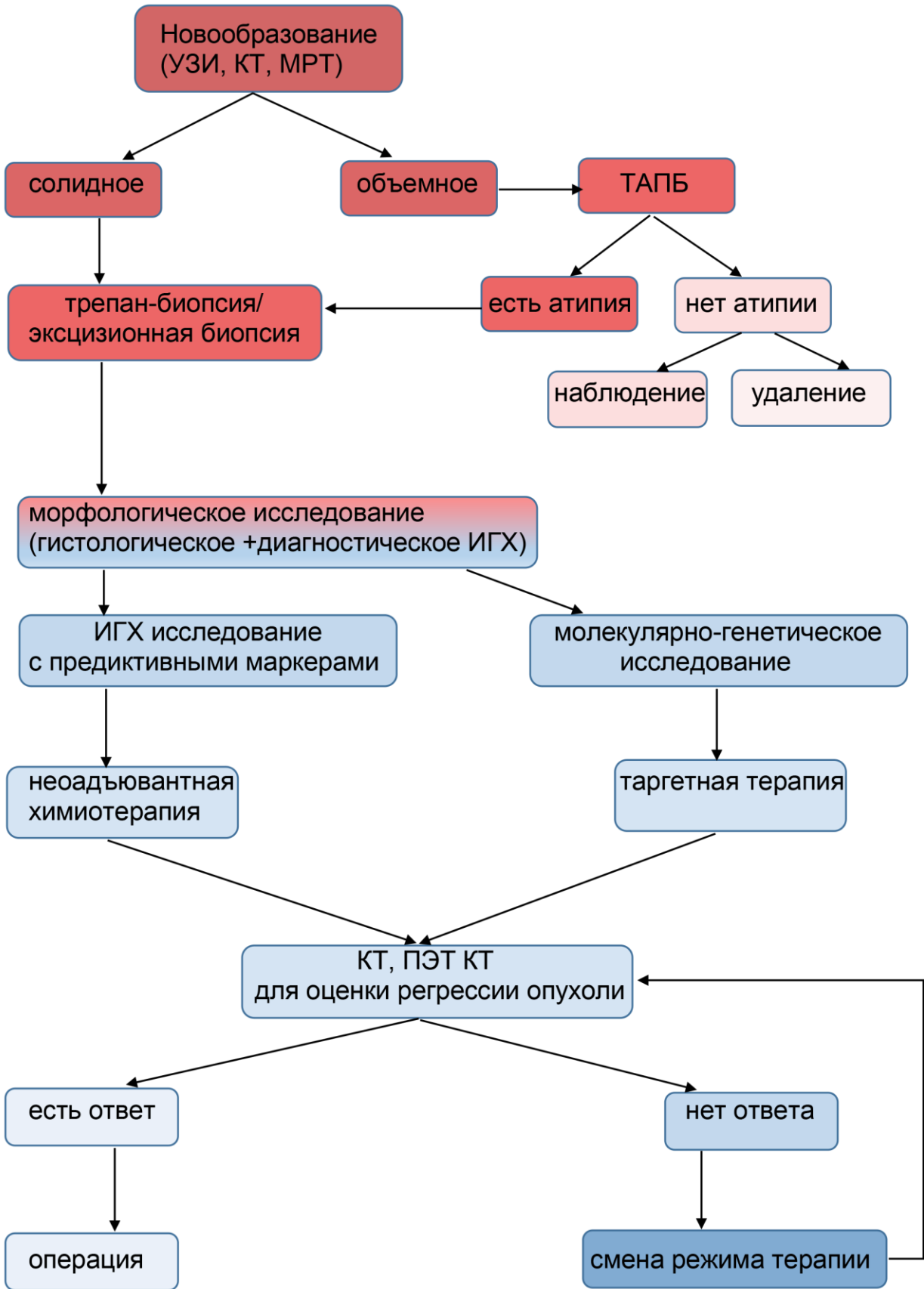


Рисунок 2. Универсальная модель персонализированного мультидисциплинарного диагностического алгоритма в онкологии.

Однако на самом деле такая полная схема только начинает занимать свое прочное место в диагностике узловых образований щитовидной железы. Лишь в 2000-е годы появилась тенденция исследования цитологического материала по ТАПБ щитовидной железы врачами патоморфологами, а не только цитологами, что увеличивает результативность и ценность данной методики в диагностическом процессе. Лишь в последние 10-15 лет в патогистологических лабораториях системно появились врачи лабораторные генетики, специалисты молекулярно-генетической онкодиагностики. И это направление постепенно развивается и становится стандартом диагностического подхода в работе с узловыми образованиями щитовидной железы, как и опухолей других локализаций [28, 80-83].

Неопластические заболевания щитовидной железы в глобальном плане делятся на две категории: неопухоли-92-93% и опухолевые узлы 7-8%. Неопухоли – это коллоидные узлы, где клетки щитовидной железы начинают активно размножаться. На сегодняшний день существует много теорий происхождения коллоидных узлов. Большинство их сводятся к тому, что при локальном дефиците йода снижается концентрация биологически активных веществ, сдерживающих пролиферацию клеток щитовидной железы, и активируется ТТГ, поскольку тиротропциты передней доли аденогипофиза получают отрицательную обратную связь о дефиците выработки контролируемого ими гормона. Хирург работает и с неопухолевыми патологиями – тиреоидитами, болезнью Грейвса, зобами различной этиологии, но наибольшее внимание привлекают опухоли. Опухоли щитовидной железы делятся на аденомы (существуют классические доброкачественные и переходные атипичные формы) и злокачественные опухоли. Согласно гистологической классификации (ВОЗ 2004) выделяют пять типов рака щитовидной железы: папиллярная карцинома; фолликулярный рак; медуллярная карцинома (С-клеточный рак); низкодифференцированная фолликулярная карцинома; анапластический низкодифференцированный рак, каждый из которых, как правило, имеет еще множество вариантов. Так, выделяют 15 гистологических вариантов папиллярной

карциномы, некоторые из которых (диффузный склерозирующий, высококлеточный, столбчатоклеточный) имеют неблагоприятный клинический прогноз. Фолликулярные карциномы также проявляют опухолевую агрессивность, особенно широкоинвазивный и низкодифференцированный варианты [28, 80-83]. Также в железе встречаются лимфомы и вторичные опухоли, которые не подлежат радикальному хирургическому лечению.

В настоящее время общепринят такой *алгоритм работы на этапе от скрининга до цитологии пунктата*: при обнаружении во время УЗИ исследования узлового образования, необходимо определить уровень ТТГ и гормонов щитовидной железы в сыворотке крови (включая кальцитонин при подозрении на медуллярный рак) и принять решение о необходимости ТАПБ. Особенности УЗИ-характеристик узла, а именно: диаметр более 1 см, неоднородное содержимое, наличие кальцинатов, характерная форма, когда узел имеет размеры «выше больше, чем шире», неровные контуры, отсутствие ободка «hallo», требуют направления больного на ТАПБ [77, 84].

Цитолог (патоморфолог) выдает одно из следующих заключений по *Bethesda system* [28, 29, 85]:

I. Материал неинформативен. Такое заключение обусловлено дефицитом в материале ТАПБ диагностических клеток, что часто зависит от опыта пунктирующего хирурга, выполнившего пункцию. В этой ситуации пациент подлежит повторному обследованию спустя 2-3 месяца.

II. Доброкачественный процесс (коллоидный узел, тиреоидит). Самая распространенная категория, когда все клеточные и другие структурные элементы ТАПБ не несут признаков опухолевого роста. В этом случае пациент направляется к эндокринологу-терапевту и подлежит УЗИ-мониторингу.

III. Атипия неясного или неопределённого значения, когда материал не позволяет ни исключить, ни верифицировать опухоль, в этой ситуации также показано повторное обследование спустя 2-3 месяца, однако часто пациенты идут на плановую операцию, что является общемировой практикой [66].

IV. Фолликулярная опухоль или подозрение на ее наличие. Эта цитологическая категория подразумевает большое разнообразие гистологических вариантов, подтверждаемых на послеоперационном этапе, но общей их характеристикой с точки зрения тактического решения для хирурга является, как правило, показание к гемитиреоидэктомии как органосохранению без высокого риска рецидива опухоли.

V. Подозрение на злокачественное опухолевое поражение. Несмотря на недостаток признаков злокачественного образования из-за дефицита клеточного компонента в материале или других особенностей мазка, цитолог видит совокупность косвенных признаков рака, в этом случае рекомендована полная тиреоидэктомия (за исключением случаев лимфомы или вторичной опухоли).

VI. Злокачественное опухолевое поражение. В этом случае признаков опухолевого поражения достаточно и врач уверен в диагнозе, рекомендации аналогичны категории V.

*Причины, приводящие к гипердиагностике ЗНО щитовидной железы:* наличие клеточного полиморфизма и папиллярных /псевдопапиллярных структур, не относящихся к злокачественным новообразованиям; укрупнение тироцитов и особенно ядер при токсических аденомах или автономных узлах; выявление подобных внутриядерным инвагинатам/инклюзиям вакуолей или ядерных борозд, обусловленных дистрофическо-дегенеративными изменениями тироцитов [28].

*Причины, приводящие к гиподиагностике ЗНО:* стертость или отсутствие в материале ТАПБ специфических цитологических признаков (при некоторых вариантах папиллярного рака, отличающихся дистрофическо-атрофическими изменениями эпителия); преобладание в материале ТАПБ микрофолликулярного структурного компартмента при фолликулярных вариантах папиллярной/медуллярной карциномы, когда устанавливается диагноз фолликулярная опухоль; избыточность в аспирате ТАПБ коллоида; преобладание некротического или воспалительного компонента; наличие сочетанной патологии железы, когда неопухолевый клеточный материал преобладает; недостаточное

количество клеточного материала и неадекватность ТАПБ, когда в аспирате есть только элементы перитуморозной ткани [28].

*Во избежание ошибок* важно помнить ряд моментов, важных для цитологического исследования ТАПБ щитовидной железы: 1) большое значение для морфолога (цитолога) имеют анамнез, возраст, данные УЗИ и исследования уровня гормонов в крови пациента; 2) низкая «клеточность» мазка, как правило, связана с неудачной пункцией; 3) при разных способах изготовления мазка и окраски материал часто разительно визуально отличается, соответственно на каждую методику важны стандартизация, опыт лаборанта и морфолога; 4) комковатые образования, нагромождение ядер и другие подобные элементы подлежат пристальному изучению; 5) клеточно-ядерный полиморфизм, митотический индекс тироцитов не имеют ничего общего с опухолевой трансформацией и даже более выражены при неопухолевых процессах, поскольку отражают дисфункциональный статус эндокринных клеток; 6) ядерные борозды и внутриядерные инвагинаты являются очень специфичными признаками для папиллярной карциномы даже в случае выявления их в единственной клетке (особенно инвагинатов) среди всех стекол с мазками пациента [28].

Понятно, что краеугольным камнем является определенная *субъективность* как в оценке цитологические характеристики мазка, так и интерпретации категорий узлов при УЗИ (предложенная УЗИ классификация узлов «TI-RADS» имеет, по мнению ряда авторов «слабые места»). И, несмотря на разработанные критерии, человеческий фактор является до сих пор определяющим. Так классификация «TI-RADS» рекомендует ТАПБ узла лишь при определенных его характеристиках, однако есть мнение, что необходимо пунктировать все узловые образования, особенно в случае подозрения на наследственную патологию щитовидной железы.

При атипии неопределенного значения (Bethesda III) подразумевается вероятность рака 5-15 %. В данном случае национальный институт рака, США предлагает проводить повторную пункцию узла. Однако нет гарантии, что при повторной пункции будет взят материал той части узла, где процессы

неогенеза наиболее выражены и очень вероятен повторный ответ Bethesda III. Принимая во внимание решающую роль цитологической диагностики в принятии тактического решения лечащим врачом, необходимо отметить, что наиболее частые причины как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов интерпретации ТАПБ не всегда связаны с недостаточным уровнем подготовки цитопатолога, который оценивает препарат и хирурга, выполняющего пункцию.

При цитологическом заключении категории III, IV и V полезно использование *дополнительных методов лабораторной диагностики*. Это реакция ИЦХ (с маркерами медуллярной карциномы, опухолей паращитовидной железы, или для верификации рака другого происхождения), молекулярно-биологическое исследование с целью выявления генетических и регуляторно-ферментных повреждений, отражающих злокачественный биологический потенциал опухоли.

Таким образом, давно существует потребность в совершенствовании методик, позволяющих объективно, используя качественные и количественные показатели, дифференцировать разные по природе узловые образования щитовидной железы, проводить их аналитическую оценку [83-86].

При выполнении патентного и литературного поиска мы обнаружили предложенные способы дифференциальной диагностики узлового зоба и опухолей щитовидной железы на основании ультразвукового метода, инфракрасного излучения, экспресс-диагностики в поляризованном свете или сцинтиграфии [87-92], которые полезны в первую очередь для принятия решения о необходимости пункции, имеющие основания и перспективы, однако эти предложения не входят в клинические рекомендации. Также есть интраоперационные методы определения микроциркуляции [93, 94], предложено использовать конфокальную микроскопию ткани в режиме реального времени [95], новые направления послеоперационных исследований на тканевом материале [96], что не удовлетворяет потребность врача в принятии решения на предоперационном этапе. Часть изобретений относится к диагностике только



доброкачественных процессов [97], что не отражает весь спектр заболеваний щитовидной железы, или у детей и подростков [98], однако рак щитовидной железы в подавляющем большинстве случаев встречается у взрослых.

Известен способ дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы, включающий ТАПБ под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием полученного пунктата, отличающийся тем, что дополнительно жидкую часть пунктата исследуют методом клиновидной дегидратации [99]. Однако этот метод не относится напрямую к исследованию трансформированных клеток, маркеров их внутренних белков, рецепторов, генов; а основан на физических свойствах жидкости, попавшей в иглу при пункции ткани в область узла и «путевого» материала. Известен способ, когда пунктат центрифугируют в 10% формалине, а осадок окрашивают на предметном стекле и изучают фазово-контрастной микроскопией, выявляя вид, количество и соотношение клеточных ансамблей [100]. Недостатком метода является неоднозначность трактовки и релевантность при пунктатах лишь высокой клеточности. При этом манипуляции с клетками могут привести к потере информативности патогномоничных признаков трансформации ядер.

Схожий способ дифференциальной диагностики фолликулярного рака и фолликулярной аденомы щитовидной железы, включающий взятие материала ТАПБ и/или соскоба с разреза ткани опухоли, удаленной во время операции, приготовление мазков, их цитологическую окраску, исследование не менее 120 клеток в трех и более мазках пациента с помощью системы анализа изображения и «нейронные сети», обученной различать фолликулярный рак и фолликулярную аденому по качественным цитологическим признакам мазков пациента с гистологически установленным диагнозом [101]. Недостатком является большой объем клеток для исследования (три мазка и более по 120 клеток не всегда возможно получить при такого типа опухолях) и ограничение использования способа только для двух нозологий. Существующие методы имеют ограничения для применения в клинике.

Наиболее широко в диагностике узловых образований щитовидной железы применяется подход, разработанный в *Национальном центре клинической морфологической диагностики в Санкт-Петербурге*, (руководитель к.м.н. *Воробьев С.Л.*), где автор проходил обучение, чьи рекомендации и опыт позволили на достаточном уровне внедрить этот метод в Крыму. При этом в нашей клинической работе мы также столкнулись с сомнительными случаями, так называемой «серой зоной», что потребовало разработать алгоритм, который бы охватывал большой спектр диагностических случаев и отражал междисциплинарный пациентоориентированный подход, был удобен в клинике и позволял применить методы молекулярной диагностики для оценки злокачественного потенциала опухоли.

Итак, важным моментом в диагностике тиреоидной патологии является необходимость работы с биоматериалом пациента на предоперационном этапе. Послеоперационная диагностика уже практически не несет информацию, влияющую на выбор действий врача, лишь верифицирует предварительный диагноз цитологического заключения (за исключением выявления метастазов в лимфатических узлах, требующих терапию радиоактивным йодом). Вся ключевая диагностика сконцентрирована на возможностях точного исследования пунктата до операции, когда решается вопрос ее необходимости и объема. Диагностические возможности классического цитологического исследования иногда ограничены, следовательно, заключения в ряде случаев имеют субъективный характер или неинформативны. Они составляют зону неопределенности, где могут помочь дополнительные молекулярные методы.

ИГХ-метод как реакция антиген-антитело, реализуемая в ткани, представляет один из специфичных способов выявления белков с установлением их тканевой локализации и количественных параметров. Однако метод можно использовать только на тканевых образцах. Существуют способы уплотнения пунктата ТАПБ щитовидной железы в фибрине или агаре до тканевой консистенции, позволяющей выполнить пропитку парафином и использовать полученный парафиновый клеточный блок (cell-block) для постановки ИГХ уже

на предоперационном этапе, сделав из взвеси клеток подобие тканевого блока. Конечно, он не отражает тканевую структуру железы, но имеет много преимуществ для выполнения молекулярных методик. При формировании клеточного блока методика уже называется не ИЦХ, которая классически ставится на стекле с мазком из пунктата, а ее можно назвать ИГХ на клеточном материале cell-block. Использование метода клеточных блоков cell-block имеет преимущества перед работой с мазками: он позволяет проводить обзорные и селективные окраски, получать серийные срезы, сохраняет структуру материала, молекулярные реакции при этом методе дают стабильный хорошо воспроизводимый результат, что позволяет проводить последовательно разные молекулярно-генетические исследования, сводя к минимуму повторные инвазивные манипуляции для пациента [28]. Поскольку если первичной цитологической оценки недостаточно, необходима ИГХ, которую целесообразно выполнять на клеточном блоке. На этом этапе мы приступили к анализу литературы, обеспечивающему поиск соответствующих молекулярно-диагностических маркеров.

### **1.3. Молекулярные маркеры в диагностике тиреоидной патологии**

Поиск маркеров малигнизации для повышения диагностической эффективности цитологического анализа узлов щитовидной железы идет в нескольких направлениях. Нет универсального достаточно чувствительного белка, верифицирующего окончательный диагноз злокачественной неоплазии щитовидной железы. Зарубежные авторы среди разновидностей биомаркеров, о которых говорится в литературе, наряду с *Hector Battifora mesothelial-1 (HBME-1)* и ТПО, используют распространенные *galectin-3 (GAL-3)* и цитокератин-19 (*CK19*). Для иммуноморфологии были предложены многими исследователями различные наборы, а комбинация *HBME-1, GAL-3* и *CK19* стала наиболее распространенной диагностической панелью [102, 103].

Исследователями была установлена экспрессия *Hector Battifora* мезотелиального антигена 1 (HBME-1) в злокачественных опухолях ЩЖ как белка, часто отличающего злокачественные новообразования в гистологических препаратах и в клеточных блоках [104].

Галектин-3/*galectin-3* (GAL-3) представляет собой белок млекопитающих, который экспрессируется различными типами клеток человека и является регулятором активности раковых клеток: роста, трансформации, апоптоза, ангиогенеза, адгезии/хемоаттракции к внеклеточному матриксу, иммуносупрессии, инвазии, создания метастатической ниши и метастазирования, трансформации опухоли и поддержанию ее трансформированных фенотипов. Такое разнонаправленное влияние на раковые клетки обусловлено его многочисленными межклеточными и внутриклеточными локализациями, где он взаимодействует с целым рядом различных регуляторных белков. Сверхэкспрессия и изменения в локализации молекул галектина-3 влияют на прогноз и представляют многообещающую терапевтическую стратегию для разработки таргетной терапии: одним из подходов к раку с высокой экспрессией галектина-3 является его специфическое ингибирование для усиления ответа на лечение. Галектин-3 может быть либо ингибирующим, либо стимулирующим апоптоз, в зависимости от его субклеточной локализации. В иммунной регуляции галектин-3 может регулировать активность иммунных клеток и способствует уклонению опухолевых клеток от иммунной системы. Он неспецифичен и используется в качестве диагностико-прогностического маркера различных видов рака [105]. Таким образом, этот маркер является примером белка, используемого для оценки уровня злокачественности, наряду с другими маркерами, связанными с клеточным циклом и его регуляцией.

Также *цитокератин 19*, *cytoskeletal 19*, *cytokeratin-19*, *CK-19* широко применяется в качестве послеоперационного диагностического маркера папиллярной карциномы щитовидной железы как белок цитоскелета, значительно увеличивающийся вследствие апоптотической гибели клеток опухоли. Показано достоверное увеличение экспрессии этого белка методами вестерн-блоттинга и

ИГХ в злокачественных опухолях щитовидной железы по сравнению с доброкачественными поражениями. Метод дает 82% специфичности и чувствительности, однако при довольно высоком пороговом значении  $>55$  нг/мл для содержания *СК-19* в образце [102, 106]. Некоторые исследователи рекомендуют комбинированное исследование ИГХ к *HBME-1*, ИЦХ с антителами к ТПО и цитохимическое определение активности дипептидил-аминопептидазы IV (*ДАП IV*) в цитологической диагностике узлов [104]. Данная комбинация разных методик не так удобна, как если бы это было однотипное исследование распространенными маркерами, имеющимися в любой лаборатории и универсально используемыми для любых тканей.

В связи с этим представляет интерес универсальный маркер *CD95 (FASR/APO-1)*, это трансмембранный белок 1-го типа, он описан как рецептор, передающий цитотоксический сигнал при связывании со специфическими белками. *CD95* и *CD95L* играют важную роль при: 1) удалении активированных взрослых Т- клеток в финале иммунного ответа; 2) уничтожении зараженных вирусом или раковых клеток при помощи цитотоксичных Т-клеток и НК- клеток; 3) уничтожение воспаленных клеток в структурах со сложными гистотканевыми барьерами, к которым относится и щитовидная железа. Этот рецептор активируется каскадным путем в сложной ферментативной цепи мембранных и цитоплазматических белков (рис. 3) [107-111].

Апоптоз – это генетически обусловленный процесс активного разрушения клеток без потери целостности, лизиса, воспаления и повреждения соседних клеток, когда образуются апоптотические тельца. Апоптотические тельца поглощаются фагоцитами и соседними клетками, которые также могут активировать противовоспалительный ответ, презентацию антигенов макрофагами. Помимо *FAS-R*, ответственного за запуск, инициацию процесса (этот этап также образно называют «принятие решения о гибели клетки»), важную роль играют цистеиновые протеазы, называемые каспазами, это протеолитически активированные гетеродимерные ферменты. Каскад каспаз играет ключевую роль уже в исполнительной фазе апоптоза. Также активно

участвует белок *p53*, который как страж генома активируется при повреждениях генетического аппарата, запуская апоптоз для удаления из пула реплицирующихся клеток с потенциально онкогенными свойствами [112, 113].

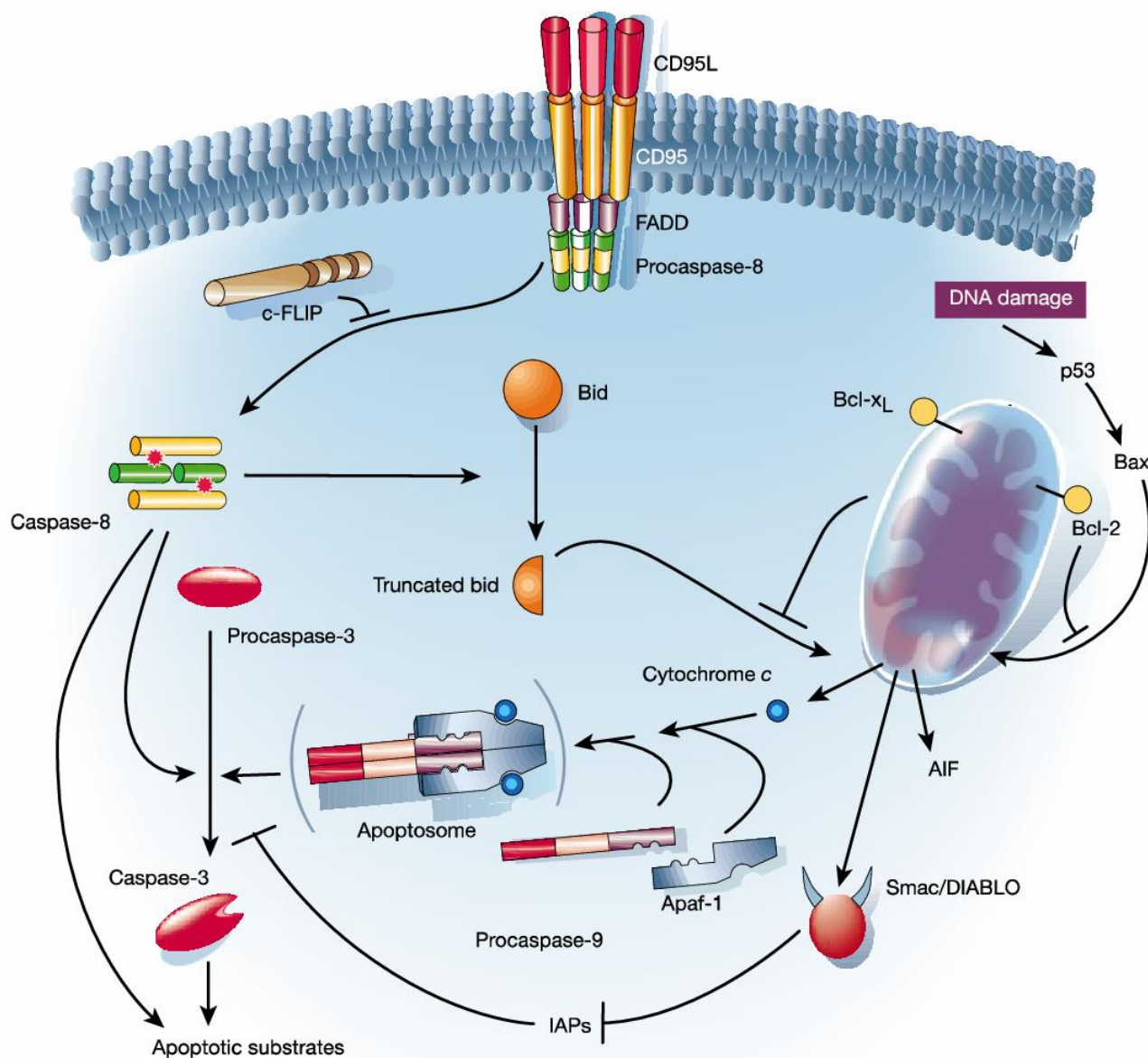


Рисунок 3. Внутренние и внешние пути, ведущие к апоптозу [110].

На сегодняшний день известно, что *CD95* представляет собой поверхностный рецептор, который обладает способностью опосредовать индукцию апоптоза в раковых клетках; для этого *CD95* запускает ряд проапоптических факторов, включая каспазы-8 с образованием апоптоз-

индуцирующего сигнального комплекса, при стимуляции лиганд *CD95 (CD95L)*; чтобы убить раковые или инфицированные вирусом клетки, иммунные клетки используют *CD95L*, однако большинство раковых клеток устойчивы к *CD95*-опосредованному апоптозу [110-113].

Как известно у нормально функционирующих тиреоидных клеток экспрессия *FAS-R* на мембране незначительна, на фоне активной экспрессии *FAS-L*, что вероятно защищает клетку от аутоиммунного повреждения. При аутоиммунных процессах в щитовидной железе на поверхности мембран тироцитов происходит повышение экспрессии *FAS-R*. В результате на эпителиальных клетках щитовидной железы одновременно экспрессируется большое количество молекул обоих видов (*FAS-R* и *FAS-L*) и аутокринное взаимодействие между ними индуцирует сигнал для включения генов, кодирующих белки каскада запрограммированной гибели тироцитов. Таким образом, определение количества *FAS-R* и *FAS-L* на мембране может быть полезным для оценки состояния тироцитов. Помимо экспрессируемого *FAS*-рецептора существует еще и так называемая растворимая форма *FAS-sFAS*, которая может быть выявлена не на мембране, а в цитоплазме или в сыворотке крови. Было обнаружено снижение сывороточного *FAS-R* у онкологических больных, что, по мнению авторов, вероятно связано с блокадой экспрессии *FAS-R* стимуляторами опухолевого роста, которые защищают опухолевые клетки от развития в них процессов апоптоза [36, 37, 38] для их бесконтрольной пролиферации. [114-117].

При этом в литературе мы не нашли исследований эффектов воздействия хронического многофакторного стресса на иммуноморфологические изменения в ткани щитовидной железы. Так же нет данных о диагностических возможностях определения *FAS-R* на мембранах тироцитов и корреляции данного показателя с гистологическим диагнозом. Таким образом, можно предположить, что критерием отличия клеток нормальной ткани щитовидной железы от клеток опухоли может быть количество *FAS-R* на мембранах этих клеток. Данные выводы предполагается проверить на цитологическом и гистологическом материале и в

эксперименте на животных, подвергнутых стрессу. Учитывая данные литературы об особенностях оценки индекса пролиферации KI-67 при патологии щитовидной железы [110-117], принято решение о параллельном исследовании и индекса пролиферации, и апоптоза.

Также в комплексной диагностике папиллярного рака ЩЖ перспективно использование *молекулярно-генетических методов*. До недавнего времени считалось, что папиллярные микрокарциномы являются опухолями с благоприятным прогнозом и медленной прогрессией и их можно «вести» путем активного наблюдения. Однако часть из них проявляет агрессивность и имеет характеристики злокачественного роста, связанные с риском местных и отдаленных рецидивов. *BRAF V600E* мутация является генетической характеристикой опухоли, имеющей такие биологические свойства. Среди различных изоформ киназы *Raf RAF V600E* типа В Мутация (*BRAF V600E*) встречается чаще всего. Точечная мутация, расположенная на 15-м экзоне гена *BRAF*, приводит к замещению в соответствующей киназе аминокислоты валина на глутаминовую в 600 положении (*BRAFV600E*). В результате этого в мутированном белке *BRAF* активируется сайт регуляции фосфорилирования, что способствует активации MAP-киназного пути и, как следствие, повышению митотической и пролиферативной активности клетки, нарушению процесса дифференциации и дисрегуляции естественной клеточной гибели. То есть мутация приводит к утрате контроля организма над ростом таких клеток и способствует их опухолевому перерождению. Известно, что в опухолях щитовидной железы *BRAF* мутации выявляются исключительно в ткани папиллярной и анапластической карциномы и отсутствует при фолликулярном, медулярном раке и доброкачественных образованиях. По данным различных авторов, частота мутаций гена *BRAF* в папиллярных тиреоидных карциномах варьирует в широких пределах – от 29% до 83%. Молекулярное тестирование папиллярных тиреоидных карцином при выборе лечебной программы позволяет персонализировать терапию. Высокая частота, специфичность и клиническая значимость мутаций *BRAFV600E* для папиллярных карцином щитовидной железы



позволяет говорить о возможности использования молекулярно-генетических тестов. Эта генетическая аномалия участвует не только в онкогенезе, но и в трансформации в агрессивную недифференцированную форму рака [118-124]. Совершенствование ультразвуковой диагностики и цитологического метода позволило чаще выявлять больных с ранними стадиями папиллярного рака, в том числе и микрокарцином размером менее 1,5 см в диаметре, часто ассоциированных с мутацией *BRAF V600E* [119]. Молекулярное тестирование может помочь в принятии решений лечебной тактики и идентифицировать микрокарциномы папиллярного рака ЩЖ с высоким риском, которые требуют радикального хирургического вмешательства, приоритетного по сравнению с клиническим мониторингом или гемитиреоидэктомией. Идентификация такой опухоли на ранней стадии чрезвычайно важна, однако часто это происходит только после операции, уже на биологическом материале парафинового блока. Таким образом, молекулярное тестирование на предоперационном этапе может помочь в принятии верных тактических решений и идентифицировать узловое образования с высоким риском.

Мы также нашли множество изобретений, к сожалению, не решающих всех клинических диагностических задач, однако раскрывающих особенности опухолевого процесса и направления работы исследователей молекулярных маркеров. Известно изобретение, когда при неопределенных цитологических заключениях выполняют молекулярно-генетическое исследование, при котором производят выделение ДНК и микроРНК из смыва с высушенного препарата и методом ПЦР со специфическими праймерами мутации *V600* в гене *BRAF* дифференцируют медуллярный и папиллярный рак [124-125]. Данная методика технически достаточно сложна.

Существует изобретение, которое обеспечивает повышение точности послеоперационной дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы за счет дополнительного определения индексов мечения цитоплазмы клеток для каждого из белков *Ki-67*, *Bcl-2* и *p53* из материала опухоли пациента, удаленной во время операции, в срезах опухоли для

ИГХ анализа оценивают коэффициент потенциальной возможности к пролиферативной активности по разработанной формуле [126].

Есть изобретение для дооперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы. Способ включает ТАПБ узловых образований под контролем УЗИ, пункционную иглу с аспиратом промывают двукратно в консервирующем растворе NovaPrep, центрифугируют, отбирают супернатанты, проводят ИЦХ анализ экспрессии *Ki-67* и рассчитывают показатель по формуле интенсивности окрашивания, выраженной в баллах (от 0 до 3), и при  $p > 0,5$  - образование признают злокачественным, при  $p < 0,5$  - доброкачественным. Применение изобретения обеспечивает повышение точности и информативности способа. Чувствительность и специфичность способа 81,8% и 93,8% соответственно [127]. Действительно общепринятым в практике для установления выраженности пролиферативных процессов в ткани является *Ki-67*, позволяющий выделить опухолевые клетки, находящиеся во всех фазах (*G1*, *S*, *G2* и *M*) клеточного цикла, кроме *G0* с помощью моноклональных антител. Однако, по мнению многих авторов [28] и по нашему опыту выполнения подобных исследований в клинике эндокринной хирургии, динамика экспрессии *Ki-67* не является патогномичным признаком опухолевого роста в тироцитах. [127]. К недостаткам его относятся недостаточная информативность и то, что ИЦХ метод в мазке без изготовления клеточного блока (*cell-block*) по релевантности в клинике уступает методу ИГХ.

Известен способ дифференциальной диагностики опухолей щитовидной железы с использованием ИГХ метода [128], включающий определение экспрессии белков *Ki-67*, *Bcl-2*, *p53* в клетках опухоли и расчета коэффициента потенциальной возможности к пролиферативной активности по формуле для дифференциальной диагностики атипичической фолликулярной аденомы и фолликулярного рака. Недостатками способа является то, что он недостаточно информативен при наиболее распространенных формах рака, что наиболее важно для врача и пациента.

Предложены способ и набор для обнаружения мутации *Q61R* в белке *NRAS* в образце опухолевой ткани щитовидной железы человека [129]. Способ включает получение образца биологического материала, взятого у пациента, выделение ДНК из указанного образца и проведение ПЦР с использованием набора для обнаружения мутации *Q61R* в белке *NRAS*. Предложенная группа изобретений позволяет повысить специфичность и чувствительность определения наличия мутантного аллеля в точке *Q61R* гена *NRAS*, а также снизить вероятность технологических ошибок во время лабораторных манипуляций. К недостаткам данного способа относятся такие, как недостаточная информативность и эффективность для дооперационной диагностики узловых образований щитовидной железы, так как способ ориентирован на анализ операционного материала и не определяет выбор способа лечения на данном этапе, также выбор маркера дискутабелен в силу низкой информативности.

Известен способ дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы человека [130], включающий взятие образца ткани узлового образования щитовидной железы, выделение суммарного пула РНК из образца, анализ уровня экспрессии гена *HMGA2*, митохондриальной ДНК, а также определение мутации *V600E* в гене *BRAF*. Измеряют уровень экспрессии *микроРНК-146b*, *-221*, *-375*. Дополнительно измеряют уровень экспрессии гена *GCM2*. Заключение о наличии и характере узлового образования составляют на основании дерева принятия решений, согласно которому анализируемый образец относят к одному, выбранному из следующей группы: узловое образование паращитовидной железы, доброкачественное узловое образование щитовидной железы, злокачественное узловое образование щитовидной железы, включающее папиллярный рак, медуллярный рак, гюртлеклеточный рак, фолликулярные опухоли с маркерами злокачественности. Изобретение обеспечивает повышение точности способа дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и расширение его функциональных возможностей. К недостаткам относится сложность, а также дороговизна метода, ведь большую

часть онкопатологии ЩЖ составляет именно папиллярный рак и большое число маркеров для него излишне.

Резюмируя вышеизложенное, важно отметить, что дальнейшее исследование выбранных показателей перспективно в поисках достоверных маркеров онкопатологии щитовидной железы. Диссонанс между возможностью и удобством использования морфологических и ИГХ методов на этапе предоперационного обследования и отсутствием точных критериев и дифференциальных маркеров, принципиально важных для выбора тактики оперативного лечения определяет актуальность и значимость работы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн исследования

Выполнена комплексная работа: 1) эксперимент – для определения воздействия стресса на самцов и самок лабораторных белых крыс и исследования иммуноморфологических маркеров в ткани щитовидной железы; 2) полное клиничко-лабораторное и иммуноморфологическое обследование пациентов с основными группами заболеваний щитовидной железы – для сопоставления с результатами экспериментальной части, подбора и отработки методик молекулярной диагностики, для разработки диагностического алгоритма; 3) ретроспективный анализ за период работы 3,5 года (с января 2019 по июль 2022 г.) – для оценки эффективности предложенного и внедренного в практику диагностического алгоритма. Междисциплинарный подход позволил сопоставить результаты физиологических методов исследования с морфологическими и МГИ ткани щитовидной железы, а также подтвердить значимость изменений количественных параметров всех изученных показателей математико-статистическими методами.

Общая схема работы, включающая набор физиологических, морфологических, молекулярных и клинических методов исследования изображена на рисунке 4. По нашему опыту, в исследовании щитовидной железы структурно-функциональный подход является оптимальным. Это созвучно теории соотношения структуры и функции в общей патологии, сформулированной отечественными клиницистами И.В. Давыдовским и В.Х. Василенко. Экспериментально-клиническая организация работы также является приоритетной. Функциональные методики дают уверенность в интерпретации морфологических результатов, они рекомендованы для науки, а в клинике – входят в стандарт обследования. Гистологические методы и микрофотографии представляют собой убедительный демонстрационный материал, а данные

подсчетов и анализа количественных параметров – доказательную базу. В клинике морфология является ключом обоснования диагноза, определяет стадию болезни, тактику лечения, эндокринологического и онкомониторинга, прогноз и дает материал для ИГХ и МГИ. Эксперимент является ключевым для обоснования научной гипотезы, а клиническая часть дает практическую ценность работы [28, 54, 131-133].

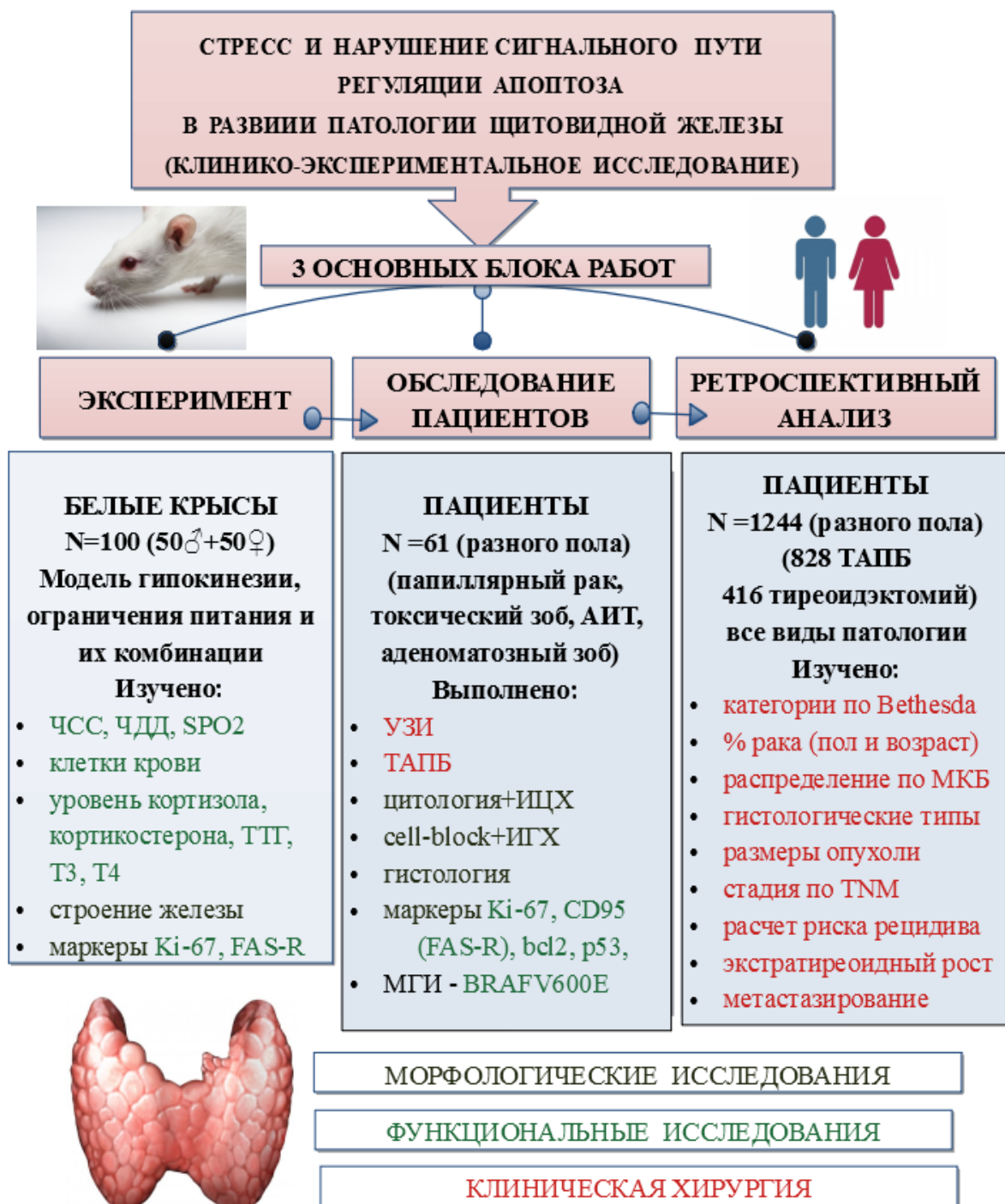


Рисунок 4. Дизайн исследования.

Во время эксперимента были соблюдены принципы биоэтики согласно отечественным стандартам и международным рекомендациям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для научных целей. Исследования, представленные в диссертации, выполнены с согласованием комитета по этике Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» (Протокол № 4 от 12.04.2022 г).

## **2.2. Эксперимент по изучению роли стресса в развитии патологии щитовидной железы и использованные морфологические и физиологические методы**

В эксперименте у самцов и самок лабораторных белых крыс выполнено моделирование изолированного стресса двух видов 1) гипокинетического и 2) алиментарного, а также их комбинации на протяжении острого и хронического опытов.

Для изучения адаптационных систем и подтверждения стрессового воздействия (верификации стадий стресса) применили физиологические методы: определение показателей крови, кардиореспираторной регуляции, динамику уровня кортизола методом ИФА.

Для изучения функции щитовидной железы определяли  $T_4$  и ТТГ методом ИФА. Для морфологического изучения щитовидной железы использовали: макроскопический метод для оценки изменений на органном уровне; гистологические методы на светооптическом уровне (окраска парафиновых срезов ткани обзорными методами) – для качественной оценки строения ткани железы; ИГХ метод (описание и количественное определение уровня экспрессии тироцитами маркеров клеточного цикла *FAS-R*, *bcl2*, *p53*, *KI-67* – для количественной оценки процессов пролиферации и альтерации.

Экспериментальная часть работы выполнена на 100 белых крысах линии Wistar, по 50 особей самцов и самок в возрасте 3-4 месяцев, массой 150-180 г.

Крыс каждого пола в возрасте 60 суток случайно разделили в группы по 5 особей, разместили каждую группу в отдельной клетке. По достижении крысами возраста 3 месяцев начали проводить исследования согласно схеме (табл. 1).

Таблица 1. Схема эксперимента по изучению стресса на лабораторных крысах

Группа, название	Возраст крыс (сут)	Масса крыс (г)	Количество крыс N	Возраст при выведении из эксперимента (сут)	Производимые манипуляции
1 Контроль	90	150,2 ±2,9	10♂,10♀	90-130	хендлинг во время ухода и взвешивания
2 Алиментарный стресс	90	151,8 ±3,6	10♂,10♀	110	ограничение питания: прокаленное зерно и дистиллированная вода с добавлением 2 мг/л NaBr – 3 недели
3 Гипокинетический стресс	90	180,5 ±3,1	15♂,15♀	97- 110	фиксация животного в пенале 20 часов и свободное содержание 4 часа в сутки – 3 недели
4 Комбинированный стресс Алиментарный + Гипокинетический	110	160,4 ±2,9	15♂,15♀	117-130	ограничение питания: прокаленное зерно и дистиллированная вода с добавлением 2 мг/л NaBr – 3 недели + фиксация животного в пенале 20 часов и свободное содержание 4 часа в сутки – 3 недели на фоне продолжающегося ограничения питания и поения бедной йодом водой

Все клетки расположили в одном помещении вивария, где соблюдены требования для содержания лабораторных грызунов, чередуя клетки с самцами и самками. *Контрольных* животных ежедневно во время кормления и замены воды и подстила подвергали хендлингу, еженедельно взвешивали.

Крыс из группы 2 для моделирования алиментарного стресса на протяжении 3 недель кормили зерном, прокаленным в автоклаве (при температуре 132°C и давлении 2,1 атмосфер в течение 30 минут) и поили дистиллированной водой с добавлением 2 мг/л NaBr (готовили воду, содержащую 10 мг NaBr на 5 л) в свободном режиме поения и кормления, не давая другого корма и воды. Таким образом, на протяжении 3 недель животные получали бедный по витаминному, белковому и минеральному составу однообразный рацион и воду, бедную йодом



и обогащённую его антагонистом бромом. Такой состав воды характерен для грунтовых вод западных районов Крыма и открытых источников пресной воды степной части Крымского полуострова (например, в г. Саки и Сакском районе), где концентрация брома превышает предельно допустимую концентрацию (0,2 мг/дм<sup>3</sup>) [14]. Длительность эксперимента острого стресса составила 7 суток, а хронического – 21 сутки.

*Гипокинетический стресс* моделировали, помещая животных на 20 часов в фиксаторы (animal restrainers) AE1001-R1 (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) для крыс среднего размера. Фиксатор сделан из прозрачного акрилового пластика, имеет внутренние габариты 165x55x55 мм и предназначен для фиксации лабораторных животных различных размеров, за счёт настраиваемой системы из двух подвижных ограничителей. Стенки и дно каждого фиксатора имеют специальные отверстия, которые обеспечивают вентиляцию и выведение отходов животных. При этом у крыс есть свободный доступ к поилкам. Фиксаторы размещали по 5 штук в клетках, где находились эти животные до начала моделирования стресса. Режим моделирования выбран таким образом, что время нахождения в фиксаторе составило 20 непрерывных часов в сутки, в том числе в ночной период активности крыс (с 14.00 до 10.00 часов) и 4 часа свободного передвижения крыс в клетке (соответственно, в околополуденное время). Длительность эксперимента острого стресса составила 7 суток, а хронического – 21 сутки (аналогично алиментарной модели стресса). Данную модель можно назвать и иммобилизационным стрессом, на наш взгляд, оба термина являются приемлемыми, и мы используем их как синонимы для обозначения воздействия на крыс в нашем эксперименте.

*Комбинированный стресс* – это фактически продолжение эксперимента с алиментарным стрессом, когда животных, выдержавших 3 недели питания бедным по составу однообразным рационом и поения водой, бедной йодом и обогащённой бромом, подвергали фиксации в рестрейнерах при тех же условиях, что и крыс группы с гипокинетическим стрессом, не меняя рациона и состава воды. То есть фоновое состояние крыс было другим, отличным от контрольной

группы и условия этого вида стресса были наиболее тяжелыми, поскольку при гипокинезии продолжали ограничение питания и специфический водный рацион.

Всем крысам еженедельно в динамике (в первый день эксперимента, а также на 7, 14 и 21 сутки от начала ограничения питания, гипокинезии или их комбинации) проводили *обследование с помощью физиологических методик*:

1. Определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС), частоту дыхания (ЧДД) и сатурацию (SpO<sub>2</sub>) – эти данные регистрировали с помощью измерительного комплекса Biopac MP150 (США) с помощью адаптированных для крыс датчиков в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология» Института «Таврическая академия» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», при методическом участии специалистов кафедры физиологии человека и животных. Запись и обработку данных осуществляли на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

2. Брали кровь для подсчета клеток крови и получения сыворотки для определения уровня гормонов методом ИФА. Перед взятием крови готовили пробирки с 100 мкл раствора ЭДТА для предотвращения быстрого свертывания. Кровь у крыс брали под эфирным наркозом (предварительно помещали животных в герметичную емкость с ватным шариком, пропитанным диэтиловым эфиром). Кровь получали, прокалывая одноразовым скальпелем подъязычное венозное сплетение. Такой метод сублингвального разреза оптимален по нашему мнению для прижизненного получения крови в достаточно большом количестве, в объеме 1,5 мл. Место прокола тампонируют. Пробирку помещали в гематологический анализатор Mythic 18 (“Orphee”, Швейцария). Также исследовали мазки крови с классической окраской по методу Романовского-Гимзы и расчётом одиннадцатиклавишным счетчиком клеток вручную при микроскопии мазка.

Нами изучена *лейкоцитарная формула крыс*, а также состояние красной крови и тромбоцитарного компонента гемограммы. При этом на основании критериев Гаркави-Квакиной лейкоцитарная формула демонстрирует и подтверждает стадию стресса для интерпретации результатов других методов

исследования. Изменения показателей крови при стрессе отражаются в лейкоцитарной формуле. Л.Х. Гаркави и Е.Б. Квакина [49, 50] исследовали изменение функций при действии стрессоров, описав неспецифические адаптационные реакции, рассчитав индекс л/нс (соотношение числа лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов), который показывает стресс-реакцию (значение <1), реакцию тренировки (резистентности) (1-2) и реакцию активации (2-4). Этот коэффициент использовали как основной показатель верификации стадии стресса (табл. 2). В этой таблице прогрессирование стресса отражено снизу-вверх, в верхней строке сформированная стресс-реакция, в нижней – пограничное, близкое к норме состояние.

Таблица 2. Критерии определения неспецифических адаптационных реакций по лейкоцитарной формуле у крыс (по Гаркави с соавт., 1998) [49, 50].

Тип реакции	Лейкоциты, %					
	эозино- филы	сегменто- ядерные нейтрофилы	лимфо- циты	моно- циты	базо- филы	л/нс
Стресс-реакция	>4	>45	<45	>6	0-1	<1
Реакция тренировки	1-4	30-45	45-60	1-6	0-1	1-2
Реакция активации:	1-4	18-30	60-80	1-6	0-1	2-4
-повышенная	1-4	18-23	61-70	1-6	0-1	2-3
-спокойная	1-4	24-30	71-80	1-6	0-1	3-4

Получали образцы сыворотки крови крыс и определяли в них *гормоны* методом ИФА, использовали оборудование Лаборатории молекулярной биологии ЦНИЛ Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» для ИФА: Иммуноферментный анализатор Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США), рН-метр стационарный 2211, Промыватель для микропланшетов W600 (Sinnova), Термошейкер для микропланшетов PST-60HL (Biosan, Венгрия). Использовали реагенты для определения гормонов в сыворотке крови методом ИФА (наборы для определения кортизола «Кортизол-ИФА» K210; кортикостерона «Кортикостерон-ИФА» 210R,

свободного и общего тироксина Т4 и трийодтиронина Т3 «Т4-ИФА», «Т3-ИФА», ТТГ «ТТГ-ИФА», Хема) и вспомогательное лабораторное оборудование общего назначения.

Для организации, планирования работ в экспериментальной части использовали рекомендованную методическую и справочную литературу [52, 134-138].

*Для морфологического исследования желез крыс выводили из эксперимента под эфирным наркозом при помощи гильотины для декапитации животных. Для выделения желез использовали набор хирургических инструментов и лупу с фиксатором для манипуляций. Рассекали кожу в regio cervicalis anterior, отделяли поверхностные мышцы срединной группы, отпрепарировав участок гортани и верхнюю часть трахеи от мышц, клетчатки и пищевода, отсекали участок воздухопроводящих путей длиной 8-12 мм. Зафиксировав препаровальной иглой трахею, отсекали от хрящей гортани и трахеи правую и левую доли щитовидной железы. Определяли линейные размеры долей щитовидной железы до ее отсечения от трахеи во избежание деформации [139-141]. Определяли ряд макрометрических параметров [142-145].*

Вычисляли объем по формуле

$$V = \pi ABC/6, \quad (1)$$

где  $V$  – объем доли ( $\text{мм}^3$ ),

$A$  – длина,  $B$  – ширина,  $C$  – толщина (мм).

Для определения структурной асимметрии долей щитовидной железы проводили исследование по формуле:

$$Ka = 100 \frac{(F1-F2)}{F1}, \quad (2)$$

где  $Ka$  – коэффициент асимметрии,

$F1$  – больший параметр измерения,  $F2$  – меньший параметр измерения.

Морфологические исследования выполнили в гистологической лаборатории Центра коллективного пользования «Молекулярная биология» на базе ЦНИЛ Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского». Использовано оборудование фирмы Leica (Германия, Австралия, Австрия) и Millestone (Италия) – комплект гистологических приборов, осуществляющих полный цикл автоматизированного преаналитического (вырезная станция LEEC LTD, гистопроцессор LOGOS, микротом Leica RM 2255) и аналитического этапов (иммуногистостейнер Leica BondMax, Микроскоп Leica MD 2000 с объективами Plan 10x, 40x, и цифровой камерой 0,5x, сканер гистопрепаратов Leica Aperio CS 2), использованы расходные материалы фирмы Биовитрум (Россия), Leica (Германия).

Для гистологического исследования доли отсекали скальпелем и помещали в 10% нейтральный забуференный формалин на 18 часов фиксации для светооптических методик и последующего пропитывания парафином.

На парафиновых срезах толщиной 4 мкм проводили морфометрические исследования. Измеряли структуры в центральном участке максимального фронтального среза правой доли при увеличении 400x. С учетом вытянутой формы фолликулов, измеряли больший и меньший диаметры, высоту тироцитов в разных участках – в центре большей и меньшей полуокружностей; площадь фолликулов. Измеряли площади коллоида и стромы (в том числе сосудов); площадь эпителия вычисляли как разность общей площади и суммы площадей коллоида и стромы. При исследовании размеров фолликулов и тироцитов изучали по 6 наибольших фолликулов в поле зрения, а при исследовании плоскостных параметров – все поля зрения. Данные исследования проводили в программе IMAGEJ, где обеспечена удобная калибровка измерений.

На основании указанных параметров вычисляли ряд индексов:

$$\text{ФКИ} = S_{\text{э}}/S_{\text{к}}, \quad (3)$$

$$\text{ИС} = S_{\text{э}}/S_{\text{с}}, \quad (4),$$

где ФКИ – фолликулярно-коллоидный индекс (показатель зрелости железы),

ИС – индекс склерозирования (отражает соотношение стромально-сосудистого и паренхиматозного компонентов),

Сэ – относительная площадь эпителия, S<sub>к</sub> – коллоида, S<sub>с</sub> – стромы;

- индекс Брауна (накопления коллоида) по формуле:

$$\text{ИБ} = D\phi / 2H\tau, \quad (5)$$

где ИБ – индекс Брауна (показывает функциональную активность),

Dφ – средний диаметр фолликула щитовидной железы,

Hτ – средняя высота тироцита.

Эти индексы являются обратными: их уменьшение свидетельствует об увеличении показателя и наоборот.

- эксцентриситет по формуле Л.В. Гербильского:

$$\text{Э} = (D - d) / d, \quad (6)$$

где Э – эксцентриситет (отражает степень отклонения фолликулов от круглой формы, являясь дополнительным функциональным критерием),

D – больший диаметр фолликула щитовидной железы, d – меньший.

Эти индексы рекомендованы для морфометрии железы и являются стандартом исследования ее структурно-функциональных изменений на тканевом уровне [133, 143, 144].

При выполнении *иммуноморфологических методик* при заливке вручную монтировали мультиблок, включая рекомендованные положительные и отрицательные контрольные образцы для каждого маркера, для последующего изготовления серийных парафиновых срезов толщиной 4 мкм.

Для постановки автоматической ИГХ в иммуностейнере использовали антитела Ki67 (клон MM1, RTU; Novocastra, Великобритания) и FAS (ab82419, разведение 1:200; Abcam, США), bcl-2 (apoptosis regulator NCL-L-BCL-2, RTU; Leica, Германия), p53 (NCL-L-p53-DO7, разведение 1:800; Novocastra, Великобритания), особенности работы с ними отражены в таблице 3.

Для визуализации использовали систему детекции на основе полимера Novolinc Polimer Detection System (Leica, Германия). С целью контроля метода в раунде окраски экспериментальных образцов поставлены реакции с использованием позитивных и негативных тканей, которые служили эталонами. В качестве негативного контроля ко всем маркерам служила ткань мозжечка. Положительным контролем для маркеров *bcl-2*, *FAS* и *Ki-67* послужила селезенка крыс, для маркера *p53* – ткань карциномы молочной железы.

Динамика клеточной кинетики определена уровнем экспрессии маркера пролиферации *Ki-67* (MM1, Novocastra, Великобритания), мембранного маркера готовности клетки к апоптозу *FAS-R* (ab 82419, Abcam, США, разведение 1:200) и белка-ингибитора апоптоза *bcl-2* (apoptosisregulator NCL-L-bcl-2, Novocastra, Великобритания, разведение 1:200), белка-регулятора апоптоза *p53*(NCL-L-p53-DO7, Novocastra, Великобритания, разведение 1:800).

Таблица 3. Антитела для ИГХ-реакции, способ оценки экспрессии и назначение.

Антитело, клон, разведение	Производитель	Назначение, что выявляет	Способ оценки реакции в световом поле, локализация
Ki-67 (RTU)	Leica, Германия	митотическая пролиферативная активность эпителия, количество клеток в G <sub>1</sub> –фазе митоза	Ядерная локализация подсчитывали количество иммунопозитивных клеток.
p53 – (NCL-L-p53-DO7) разведение 1:800	Novocastra, Великобритания	белок гена-супрессора опухолевого роста, маркер клетки с поврежденной ДНК, подлежащей элиминации	
FAS-R (маркер CD 95)	Leica, Германия	каспазный путь активации апоптоза, готовность клеток к гибели	Мембранная и цитоплазматическая локализация. Оценка полуколичественным методом с учётом интенсивности реакции
bcl-2 (apoptosis regulator NCL-L-BCL-2) (RTU)	Leica, Германия	белок-ингибитор апоптоза, антиапоптотический фактор, антагонист FAS-R	

Оценку экспрессии ядерного маркера *Ki-67* и *p53* проводили методом подсчет всех иммунопозитивных клеток при увеличении 400х в 10 полях зрения. Оценку маркеров с мембранной и цитоплазматической локализацией проводили

полуколичественным методом. Пользовались следующей шкалой: 0 – окрашивание отсутствует, либо имеется слабое/среднее окрашивание менее 25% клеток; 1 + - слабоинтенсивное окрашивание более 25 % клеток, либо окрашивание сильной интенсивности менее 25% клеток; 2+ - 25-75% клеток имеют окрашивание средней интенсивности, либо 25-50% клеток окрашены высоко-интенсивно; 3+ - более 75% клеток окрашены средне-интенсивно, либо более 50% клеток окрашены высоко-интенсивно.

Протокол ИГХ-исследования. Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм помещали на высокоадгезивные стекла X-TRA M/Slides (Leica). Постановка ИГХ-реакции производится по протоколу, предусмотренному в иммуногистостейнере Bond-Max. Депарафинизация срезов осуществляется в растворе для депарафинизации на основе цитратного буфера Bond Dewax Solution (Leica, Великобритания) 10 мин при температуре 70°C. Высокотемпературная демаскировка антигенов с помощью раствора для высокотемпературной демаскировки на основе EDTA буфера, pH 8,9 BondEpitopeRetrieval 2 (Leica, Великобритания) либо цитратного буфера pH 5,9-6,1 BondEpitopeRetrieval 1 (Leica, Великобритания) в течение 20 минут при температуре 96°C. Инкубация с первичными антителами (наименование купленных антител по каталогу) в рекомендованном производителем разведении в течение 15 минут при комнатной температуре. Разведение осуществляется с помощью раствора для разведения антител на основе трис-буфера Bond Primary Antibody Diluent (Leica, Великобритания). Блокировка эндогенной пероксидазы (5 минут при комнатной температуре) а также визуализация (инкубация с вторичными антителами 8 минут при комнатной температуре, инкубация с полимером в течение 8 минут и инкубация с хромогеном 10 минут, контрастирование ядер гематоксилином 5 минут) осуществляется с помощью набора реагентов для детекции на основе полимера Bond Polymer Refine Detection [DS9800] (в состав набора входят пероксидазный блок, вторичные кроличьи антимышьи антитела (класс IgG), антикроличьи антитела (класс IgG) меченые полимером, ДАБ, раствор гематоксилина). После каждого этапа производится промывка препарата с



помощью отмывочного раствора на основе Трис-буфера, pH 7,7, BondWashSolution 10X Concentrate (Leica, Великобритания) в разведении 1:10. В протоколе постановки реакции с *FAS* увеличили продолжительность пероксидазного блока вдвое, а также добавили инкубацию с альбумином в течение 10 минут для профилактики фонового окрашивания ввиду высокого содержания АФК и белка в тироцитах и коллоиде.

Для гистологической интерпретации изменений и отработки методик пользовались специализированными методическими пособиями и рекомендованной номенклатурой [132, 142, 146-148].

### **2.3. Методы клинических диагностических исследований пациентов**

Общие клинические методы в рамках диагностической работы выполняли при рутинном обследовании пациентов, обратившихся амбулаторно или проходящих стационарное лечение в онкологическом отделении КММЦ Святителя Луки. Они включали сбор анамнеза, осмотр, физикальные методы, УЗИ-диагностику с ТАПБ, определение уровня гормонов щитовидной железы в сыворотке крови. Пациенты были информированы о проводимом обследовании и подписывали информированное добровольное согласие, включающее не только стандартную диагностику и лечение, но и выполнение дополнительных методов МГИ исследования.

В гистологической лаборатории ЦНИЛ, обслуживающей КММЦ Святителя Луки, выполняли морфологические методы: цитологическую оценку пунктата и гистологическое исследование операционного материала с применением, помимо классических методик, молекулярной диагностики экспрессии маркеров клеточного цикла *FAS-R*, *bcl 2*, *p53*, *Ki67*, при показаниях - исследование мутаций *BRAF V600E* на операционном материале и клеточных блоках (cell-block); световую микроскопию и сканирование гистологических препаратов.

В совместной работе диссертанта и морфологов обследован 61 пациент в одном последовательном протоколе: УЗИ+ТАПБ → цитология мазков → операция → гистология+ИГХ+ИЦХ+ cell-block.

Несомненно, ИЦХ и cell-block – это *предоперационный этап*, в нашей работе мы не ставили цель диагностики на догоспитальном этапе этими методами, а набирали материал для установления закономерностей и сравнения этих трех методик. Поэтому для исследовательских задач брали пунктат во время операции с удаленной железы тотчас перед ее погружением в формалин для исключения ненужной травмы при повторных пункциях, поскольку от одного прокола материала не хватает для трех методик (цитология, ИЦХ и cell-block). Техника пункции соответствовала классическому варианту ТАПБ.

*Критериями включения* в исследование были мужчины и женщины возраста от 30 до 75 лет, жители Республики Крым, пациенты клиники эндокринной хирургии КММЦ Святителя Луки (структурное подразделение ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского»), нуждающиеся по данным цитологии ТАПБ или по клиническим показаниям в оперативном лечении – геми- или тотальной тиреоидэктомии. *Критерием исключения* было отсутствие потребности в операции на щитовидной железе.

*Пункцию* проводил автор работы под УЗИ контролем по стандартной методике в хирургическом отделении КММЦ Святителя Луки. Материал ТАПБ для цитологии доставляли в контейнерах на стандартных стеклах, для ИЦХ – на высокоадгезивных стеклах фирмы Leica (Германия). Для клеточных блоков использовали нативный пунктат. Операционный материал, полученный при тиреоидэктомии или гемитиреоидэктомии, фиксировали в нейтральном забуференном формалине в течение суток.

*Цитологию* мазков проводили при окраске методом Романовского в вариации Майн-Грюнвальд-Гимзы.

Для *ИЦХ* мазки фиксировали в парах формалина и сушили в термостате ночь при 36°C. Используются протоколы постановки реакции: высокотемпературная демаскировка (20 минут при температуре 90°C с буфером

Bond Epotop Retrieval Solution 2, рН 9.0), подавление внутриклеточной пероксидазы (5 минут при комнатной температуре), инкубация с первичным антителом (15 минут при комнатной температуре), детекция системой Bond Polimer Refine Detection (Leica, Великобритания), включающая докраску ядер гематоксилином. Для реакции с антителами FAS время инкубации с первичным антителом было увеличено до 40 минут. Для ИГХ и cell-block – аналогично после депарафинизации.

Для изготовления *клеточного блока cell-block* использовали два способа: агаровый и тромбиновый. Оба показали хороший результат. Агаровый способ изготовления включает такие этапы: центрифугирование пунктата, удаление надосадочной жидкости, подогрев агара (HistoGel technique) в микроволновой печи 5-10 секунд, добавление 5-8 капель агара на дно центрифужной пробирки с полученным центрифугатом, перемешивание, охлаждение 5 минут в морозильной камере, перенос образовавшегося сгустка в кассету с прокладками для фиксации и проводки. При тромбиновом способе пунктат фиксировали, промывали, взвесь клеток помещали в стеклянную пробирку, добавляли 500 мкл цитратной плазмы и 5 мкл хлорида кальция, инкубировали в термостате 15-20 минут при 37°C, формируя тромбиновый сверток как связующую основу, далее обезвоживали и пропитывали парафином. Из готовых блоков изготавливали срезы по стандартной методике и инструкциям гистологических реагентов и приборов.

Мы разработали свой *подход для верификации сомнительных цитологических изменений*, например, таких как папиллярные структуры, плазмостоидность цитоплазмы, наличие внутриядерных борозд, нагромождение ядер и их укрупнение путем постановки ИЦХ реакции, по сути являющейся ИГХ методом с двумя маркерами на клеточном блоке cell-block.

Он включает реакцию с маркером пролиферации Ki-67 и с апоптотическим маркером FAS-R. Данный этап выполняли по стандартной методике, включающей депарафинизацию, демаскировку, промывку, обработку первичным антителом, обработку системой детекции, окрашивание ядер, промывку и заключение под стекло. По полученным значениям уровней экспрессии маркера Ki-67 и маркера

*FAS-R* в абсолютных числах определяли злокачественный потенциал опухоли путем вычисления индекса злокачественности *Z* по формуле:

$$Z = FAS-R / (Ki67 + 1), \quad (7)$$

где *FAS-R* – среднее количество позитивных клеток, окрашенных маркером апоптоза,

*Ki-67* – среднее количество позитивных клеток, окрашенных маркером пролиферации, по 10 полям зрения в препарате.

Критерии оценки индекса и его интерпретация более подробно изложены в главе собственных результатов работы.

Пробоподготовку для *иммуноморфологического исследования на послеоперационном этапе* проводили по стандартной методике [150]. На вырезной станции LEEC ltd (Великобритания) вырезали фрагменты железы, которые фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина (Leica, Германия) на протяжении не менее 12 и не более 18 часов с последующей стандартной проводкой и пропитыванием парафином в процессоре LOGOS (Mielstone, Италия) по протоколу, рекомендованному производителем.

С каждого блока один срез окрашивали гематоксилином и эозином и 4 среза тканей окрашивали ИГХ-методом, по набору антител и протоколу идентично антителам, использованным в эксперименте на животных (табл. 3).

При показаниях для исследования *мутаций BRAF V600/Es* (подозрение на наследственный характер опухоли при наличии микрокарциномы, высокая степень злокачественности, быстрый рост опухоли крупного размера), делали стружку из парафинового блока (операционного материала или клеточного блока ТАПБ). МГИ проводили по стандартной методике полимеразной цепной реакции в режиме реального времени ПЦР-РВ [151, 152]. Для экстракции ДНК использовали набор для выделения ДНК из тканей, заключенных в парафин «ДНК-Ткань-Ф-100» по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 (ООО «ТестГен», Россия). Для выявления мутаций использовали набор реагентов для выявления статуса мутаций гена BRAF методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени, в пробе геномной ДНК человека из образцов, фиксированной

в парафине ткани «Тест- BRAF-ткань» по ТУ 21.20.23-007-97638376-2017 (ООО «ТестГен», Россия). Использовали амплификатор LightCycler®96 System (Roche, Швейцария). Для постановки реакции использовали методики, рекомендованные производителями оборудования и реагентов.

#### **2.4. Метод ретроспективного анализа и исследуемые параметры**

Собраны данные из отделения эндокринной хирургии КММЦ Святителя Луки (университетская клиника) и ЦНИЛ Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» в периоды 1) до разработки нового диагностического алгоритма; 2) в период его внедрения и апробации; 3) использования как рутинного метода. Эти периоды совпали с периодом до пандемии, во время и после пандемии COVID-19. Мы анализировали как показатели, связанные с лабораторной оценкой мазка и морфологической диагностики на послеоперационном этапе, так и заболеваемость, связанную с внешними факторами (в том числе пандемия, социально-экономическая ситуация и другие внешние изменения).

Проведена статистическая работа с: 1) заключениями цитологической диагностики и 2) заключениями патоморфологической диагностики, на этапе после операций, выполненных автором данной работы. Тип исследования: региональное ретроспективное. Критерии включения: пациенты, обратившиеся с 01.01.2019 по 31.07.2022 года в отделение эндокринной хирургии с заболеваниями щитовидной железы. Критерии исключения: пациенты с патологией щитовидной железы, не требующей хирургического лечения, и лица, обратившиеся вне исследуемого периода. Были проанализированы такие данные: на дооперационном этапе цитологические классы по Bethesda и их соотношение в структуре цитологических заключений; на послеоперационном этапе вид оперативного вмешательства, диагноз по МКБ и их сопоставление с данными цитологии. Для злокачественных новообразований – гистологические типы

опухоли, размеры, стадия по TNM, экстратиреоидный рост, метастазирование. Также использована классификация риска рецидива заболевания по рекомендациям Американской ассоциации специалистов по щитовидной железе «Калькулятор стадий рака щитовидной железы» (AJCC 8-е издание) [86]. Она представляет собой руководство American Thyroid Association (ATA) по ведению взрослых пациентов с узлами щитовидной железы и дифференцированным раком щитовидной железы, разработанное целевой группой специалистов.

Согласно поставленной цели пациенты были разделены на три группы в зависимости от даты операции:

- группа 1: январь 2019 г. – февраль 2020 г., 14 месяцев (до разработки алгоритма);
- группа 2: март 2020 г. – январь 2022 г., 23 месяца (во время разработки и апробации алгоритма);
- группа 3: февраль 2022 г. – июль 2022 г., 6 месяцев (после внедрения алгоритма).

За весь период, включающий 3 этапа, выполнено 1244 исследования, 828 ТАПБ и 416 оперативных вмешательств на щитовидной железе.

## **2.5. Методы математико-статистической обработки результатов**

При анализе количественных показателей результаты сводили в структурированную табличную базу данных в лицензионной программе «MS Office – Excel». В этой программе согласно рекомендациям производителей на персональном компьютере проводили первичную статистическую обработку и графическое оформление полученных результатов. Рассчитывали среднюю арифметическую для группы, ошибку средней (в таблицах глав 3-6 приведены показатели  $M \pm m$ ), среднеквадратическое отклонение, коэффициент вариации, доли и относительные величины (%), отклонение величины в опыте от величины в контроле (%).

Использовали параметрические и непараметрические методы. Перед использованием параметрического критерия проверяли распределение на

нормальность, когда 68% всех его наблюдений лежат в диапазоне  $\pm 1$  стандартное отклонение от среднего, а диапазон  $\pm 2$  стандартных отклонения содержит 95% значений. При использовании метода вариационной статистики для оценки значимости отличий цифровых данных при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали результаты при значении  $p$  (вероятность ошибки)  $\leq 0,05$ , рассчитывая значение  $t$  в зависимости от числа наблюдений. Определяли форму и меру связи между показателями по методу Спирмена.

Для физиологических методик и подсчета уровня экспрессии статистический анализ и обработку полученных данных проводили преимущественно с помощью непараметрических статистических методов. Внутригрупповые различия оценивали с помощью критерия Вилкоксона, а достоверность различий между группами – с помощью критерия Манна-Уитни. Использован кластерный анализ полученных данных.

В ретроспективном анализе данные проанализированы непараметрическими методами по критерию хи-квадрат в Excel. Часть расчетов выполнили с помощью программного пакета «STATISTICA – 10.0» portable.

Все числовые показатели различий считали значимыми, статистически достоверными при ошибке  $P$  менее 5%. Пользовались данными и рекомендациями методической литературы [153, 154].

Использовали средства измерительной техники, прошедшие метрологическую поверку, и оборудование, проходящее аттестацию и регулярное техническое обслуживание в отделах ЦНИЛ, имеющей разрешение на выполнение соответствующих научных и медицинских исследований (Санитарно-эпидемиологическое заключение, № 82.01.01.000.М.001709.07.18 от 25.07.2018 о соответствии лаборатории государственным нормативам для выполнения исследований по гистологии, организации здравоохранения и общественному здоровью, клинической лабораторной диагностике и лабораторной генетике) и уведомление от Росздравнадзора о разрешении этих видов деятельности.

### ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АДАПТАЦИОННЫХ СИСТЕМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА

#### 3.2. Динамика функциональных показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем

В первые сутки исследования у лабораторных животных не было зарегистрировано значимых различий в значениях всех изученных показателей кардиореспираторной системы (ЧСС, ЧДД и SpO<sub>2</sub>), что позволило подтвердить однородность групп и фактически приравнять результаты тестирования крыс контрольной группы и крыс подопытных групп до начала стрессового воздействия (табл. 4).

*Изменение показателей частоты сердечных сокращений у лабораторных животных.*

У лабораторных животных, подвергнутых длительному гипокинетическому стрессу на протяжении исследования было зарегистрировано значительное увеличение показателя ЧСС. Так, в группе самцов на 7 сутки исследования значения данного показателя увеличились незначительно на 2,0% ( $p > 0,05$ ), следует отметить, что на 14 сутки исследования ЧСС также оставалась умеренно повышенной на 2,2% ( $p > 0,05$ ), а к 21 суткам исследования увеличение значений ЧСС достигло уровня статистической значимости и составило плюс 7,8% ( $p < 0,05$ ) относительно значений данного показателя, полученных у самцов этой группы в первые сутки исследования (табл. 4).

Кроме того, данные полученные в группе самок, подвергнутых длительному гипокинетическому стрессу, свидетельствуют об аналогичных изменениях, зарегистрированных и в группе самцов. Так, на 7 сутки исследования значения ЧСС у этих животных имеют тенденцию к увеличению на 2,6% ( $p > 0,05$ ), на 14 сутки значения данного показателя также увеличены на 2,5% ( $p > 0,05$ ) (табл. 4). Как и в группе самцов, эти изменения не достигли уровня статистической



значимости. Отметим, что лишь к 21 суткам в группе самок с гипокинетическим стрессом нами зарегистрировано достоверное увеличение значений показателя ЧСС на 10,3% ( $p < 0,05$ ), относительно значений данного показателя, у этих животных в первые сутки исследования (табл. 4).

Таблица 4. Значения показателя частоты сердечных сокращений (уд/мин) у лабораторных животных под влиянием длительного гипокинетического и комбинированного стресса

Группа	Гипокинетический стресс		Гипокинетический + алиментарный стресс (комбинированный стресс)	
	самки	самцы	самки	самцы
Длительность эксперимента				
1 сутки (контроль, фон)	341,3±8,0	340,4±8,7	332,3±7,7	336,8±7,1
7 сутки (острый стресс)	350,1±4,8	347,8±9,4	336,5±9,5	350,9±7,4
14 день (подострый стресс)	349,9±9,6	348,0±13,6	359,1±9,5	359,6±9,5
21 день (хронический стресс)	376,3±7,6 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>	367,1±12,7 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b> <b><math>p_2 &lt; 0,05</math></b>	409,1±5,8 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b> <b><math>p_2 &lt; 0,05</math></b>	392,0±8,5 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>

*Примечание:*  $p_1$  – достоверность различий по критерию Вилкоксона относительно значений, полученных в первые сутки исследования и в контроле;  $p_2$  – по критерию Манна-Уитни при сравнении изолированного гипокинетического и комбинированного стресса.

У животных, которые находились в условиях *ограниченного питания* нет статистически значимых отличий данных показателей от контрольной группы и между экспериментальными группами, то есть изолированный алиментарный стресс не вызывает существенных изменений показателя ЧСС, что продемонстрировано в таблице, поскольку 3 недели алиментарного стресса было фоном для начала эксперимента с комбинированным стрессом.

У животных, которые находились в условиях *гипокинезии и ограниченного питания* на протяжении исследования, была зарегистрирована значимая динамика изменения значений показателя ЧСС, схожая с группой гипокинетического стресса. Однако отметим, что данные изменения были выражены в еще большей степени, чем у лабораторных животных, подвергнутых монофакторному воздействию гипокинезии. Так, в группе самцов на 7 сутки, также на 14 сутки исследования зарегистрирована тенденция к увеличению значений показателя ЧСС – на 4,1% ( $p>0,05$ ) и 6,7% ( $p>0,05$ ), соответственно (табл. 4). Отметим, что к 21 суткам исследования в группе самцов с комбинированным стрессом увеличение показателя ЧСС достигло уровня статистической значимости и составило 16,4% ( $p<0,05$ ), относительно значений ЧСС, которые были получены в первый день исследования у животных этой группы (табл. 4).

Отметим, что в группе самок, подвергавшихся длительному гипокинетическому стрессу на фоне ограничения питания, было зарегистрировано на 21 сутки исследования максимальное, по сравнению с другими группами, увеличение значений показателя на 23,1% ( $p<0,05$ ), относительно значений показателя ЧСС у крыс данной группы в первые сутки исследования (табл. 4).

Таким образом, данные полученные нами у лабораторных животных четырех групп (самцов и самок с гипокинетическим и комбинированным видами стресса), свидетельствуют о том, что длительная гипокинезия оказывает существенное положительное хронотропное действие на регуляцию работы сердца. Данные изменения опосредуют влияние на другие системы организма лабораторных животных, вызывают функциональные перестройки, связанные с напряжением регуляторных систем. При этом острый и подострый стресс длительностью 1-14 суток не вызывает значимых изменений данного показателя работы сердца и его регуляции. Следует отметить, что максимальное увеличение ЧСС регистрируется у животных, находившихся в условиях ограниченного движения и питания, что свидетельствует о том, что недостаток жизненно

необходимых химических элементов в пище еще больше усугубляет негативные последствия ограничения подвижности.

*Изменение показателя частоты дыхания у лабораторных животных.*

У крыс, которые подвергались длительному иммобилизационному (гипокинетическому) стрессу, на протяжении исследования были зарегистрированы существенные изменения в динамике значений показателя ЧДД. Так, при анализе значений, полученных в группе самцов при гипокинезии, уже на 7 сутки исследования показатели ЧДД имеют тенденцию к снижению на 8,2% ( $p > 0,05$ ), относительно значений, полученных у животных этой группы в первые сутки исследования или группы контроля.

Таблица 5. Значения показателя частоты дыхания у лабораторных животных под влиянием длительного гипокинетического и комбинированного стресса

Группа	Гипокинетический стресс		Гипокинетический + алиментарный стресс (комбинированный стресс)	
	самки	самцы	самки	самцы
Длительность эксперимента				
1 сутки (контроль, фон)	113,2±2,6	115,8±2,2	116,9 ±2,5	112,8±3,0
7 сутки (острый стресс)	111,5 ±4,0	106,3±3,0	103,1 ±6,3	101,2±3,4 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>
14 день (подострый стресс)	94,8±8,1	97,0±4,6 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>	98,3 ±6,4	103,6±4,1 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>
21 день (хронический стресс)	87,1±1,8 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>	89,9 ±2,0 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>	81,5±1,4 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b> <b><math>p_2 &lt; 0,05</math></b>	91,2 ±3,7 <b><math>p_1 &lt; 0,05</math></b>

*Примечание:*  $p_1$  – достоверность различий по критерию Манна Уитни относительно значений, полученных в первые сутки исследования и в контроле;  $p_2$  – при сравнении изолированного гипокинетического и комбинированного стресса.

Заметим, что на 14 сутки ограничения подвижности значения данного показателя у этих животных достоверно снижаются на 16,2% ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.), а

к 21 суткам исследования зарегистрировано максимальное снижение значений показателя ЧДД на 22,4% ( $p < 0,05$ ), относительно значений, полученных в первые сутки эксперимента (табл. 5).

Вместе с тем, в группе самок, находившихся в условиях ограниченной двигательной активности, зарегистрированы аналогичные изменения значений показателя ЧДД. Так, на 7 и 14 сутки исследования зарегистрирована тенденция к снижению значений показателя ЧДД на 1,5 ( $p > 0,05$ ) и 16,3% ( $p > 0,05$ ) соответственно, а к 21 суткам снижение значений данного показателя выражено максимально и достигает уровня статистической значимости – на 23,1% ( $p < 0,05$ ), относительно значений, полученных у этих животных в первые сутки исследования (табл. 5).

У животных, которые находились в условиях *ограниченного питания* нет статистически значимых отличий данных показателей от контрольной группы и между экспериментальными группами, то есть изолированный алиментарный стресс не вызывает существенных изменений показателя ЧДД (как и ЧСС).

Следует отметить, что при изучении воздействия *комбинированного стресса* на организм лабораторных животных, показано, что зарегистрированные значения показателя ЧДД имеют динамику аналогичную группам самцов и самок с изолированным действием гипокинезии, однако полученные изменения данного показателя выражены в еще большей степени (табл. 5). Так, у самцов группы комбинированного стресса уже на 7 сутки исследования зарегистрировано достоверное снижение значений показателя ЧДД на 10,2% ( $p < 0,05$ ), а максимального уровня снижения ЧДД достигает к 21-м суткам исследования – на 19,1% ( $p < 0,05$ ), относительно значений полученных в первые сутки исследования и в контроле (табл. 5). У самок, которые находились в условиях длительной гипокинезии и ограниченного питания, зарегистрировано, что достоверное снижение значений показателя ЧДД происходит с 14 суток исследования на 15,9% ( $p < 0,05$ ), а максимальное снижение значений данного показателя зарегистрированы на 21 сутки исследования – на 30,3% ( $p < 0,05$ ), по отношению к значениям, полученным в первые сутки исследования (табл. 5).

Таким образом, обращает на себя внимание противоположная направленность в изменении ЧСС и ЧДД (рост ЧСС при одновременном снижении ЧДД) и некоторая универсальность тенденций реакции – ее незначимость на этапах острого и подострого стресса и манифестация в хронической фазе, а также общее усугубление показателей в условиях комбинированного стрессового воздействия.

Известно, что респираторная система является одной из главных систем, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность и адаптацию организма к факторам среды. Отметим, что респираторная система, как и сердечно-сосудистая система, одна из первых реагирует на различные стрессорные воздействия изменением частоты дыхания. Таким образом, данные, зарегистрированные нами, свидетельствуют о развитии выраженной стресс-реакции, развивающейся у лабораторных животных в ответ на действие как монофакторного гипокинетического стресса, так и его комбинации с алиментарным стрессом. Вероятно, полученные нами данные о снижении значений ЧДД у животных всех групп под влиянием как гипокинетического стресса, так и в комбинации с ограниченным питанием можно объяснить развитием некардиогенного отека легких с 14-21 суток исследования. В литературе описаны случаи снижения частоты дыхания при высокой ЧСС у животных на фоне тяжелых метаболических сдвигов. Согласно исследованиям острого респираторного дистресс-синдрома, его патогенеза и лечения, в основе некардиогенного отека легких, может лежать повреждение альвеоло-капиллярной мембраны (аэрогематического барьера) с последующим повышением проницаемости капилляров за счет воспалительного процесса, вызванного стрессом. Подтверждением данного факта являются графики дыхательного ритма у животных в первые и последующие сутки исследования. Так из рисунков 5 и 6 видно изменение нормального паттерна дыхания с появлением актов апноэ у животных с 14 суток исследования.

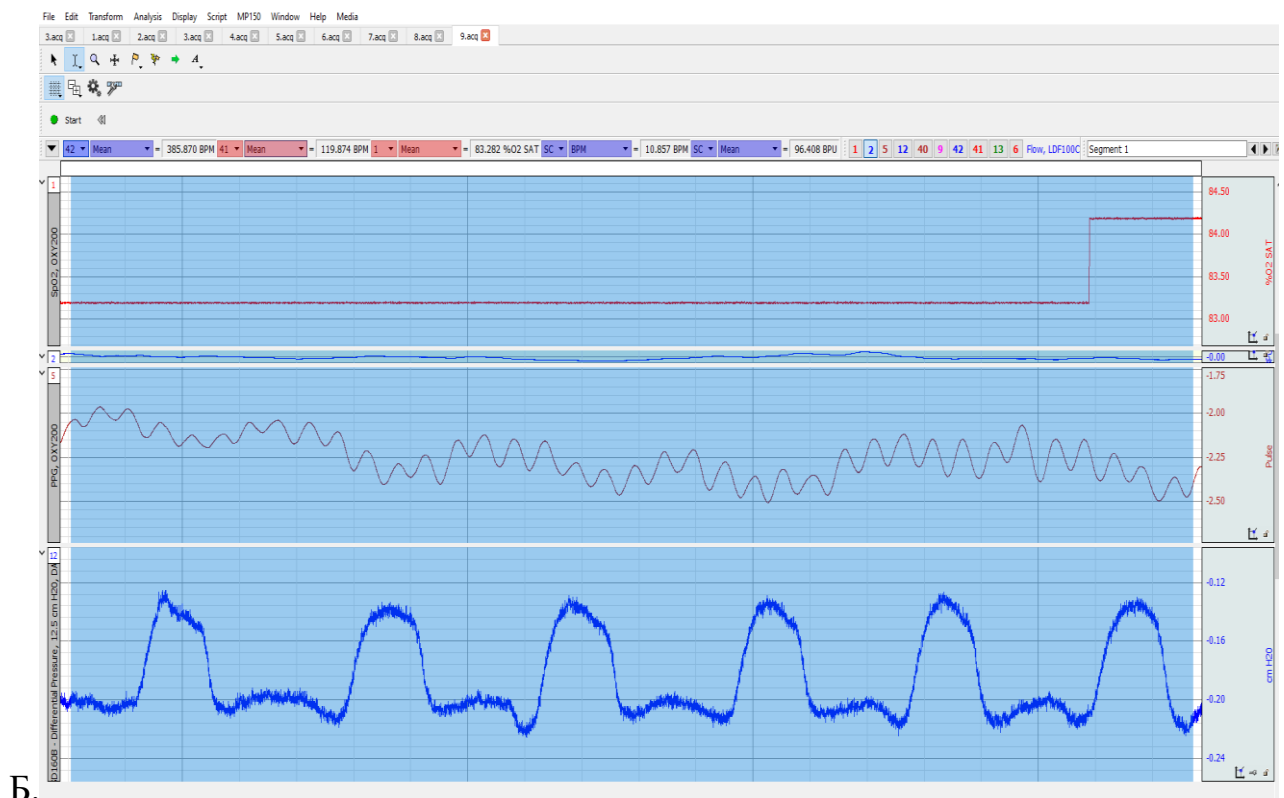
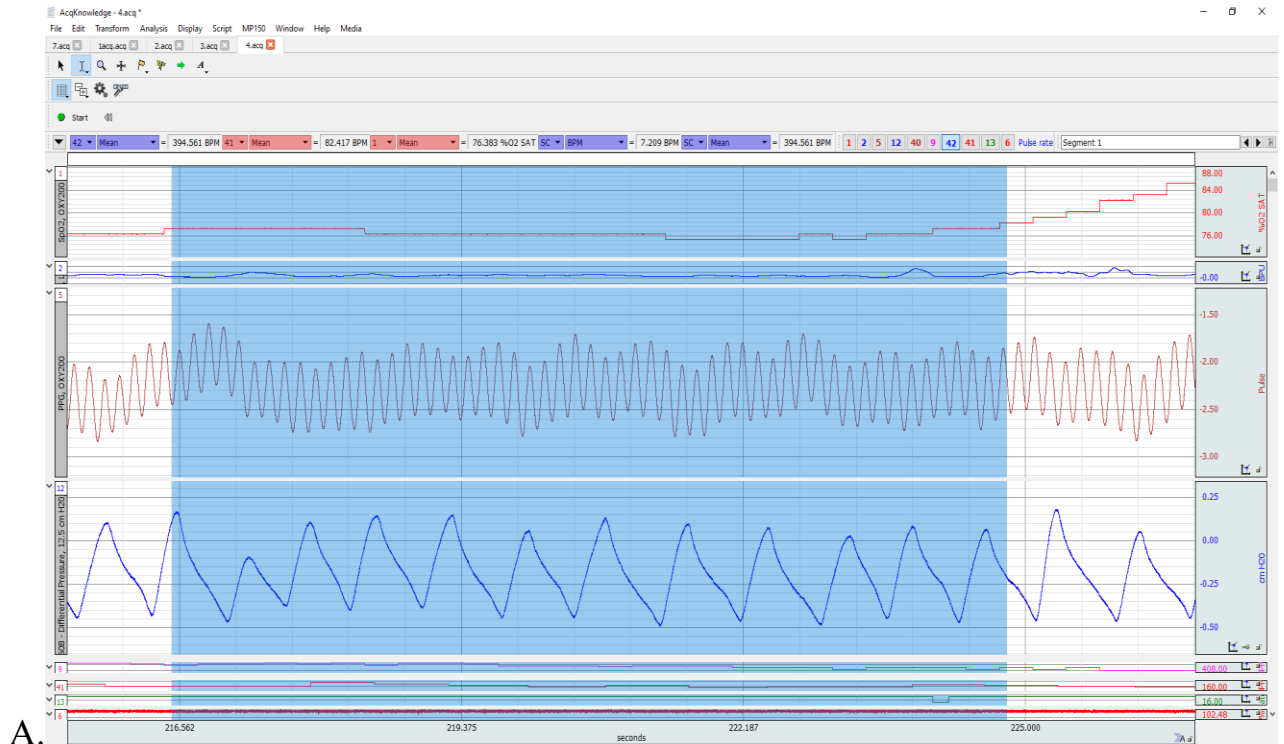


Рисунок 5. Паттерны сердечного ритма и дыхания у лабораторных животных групп с гипокинезией в разные сроки исследования (острый и подострый период). А – на 1 сутки исследования в группе с гипокинезией. Б – на 14 сутки исследования в группе с гипокинезией. Кривая красного цвета – сердцебиение, синего цвета – дыхание.

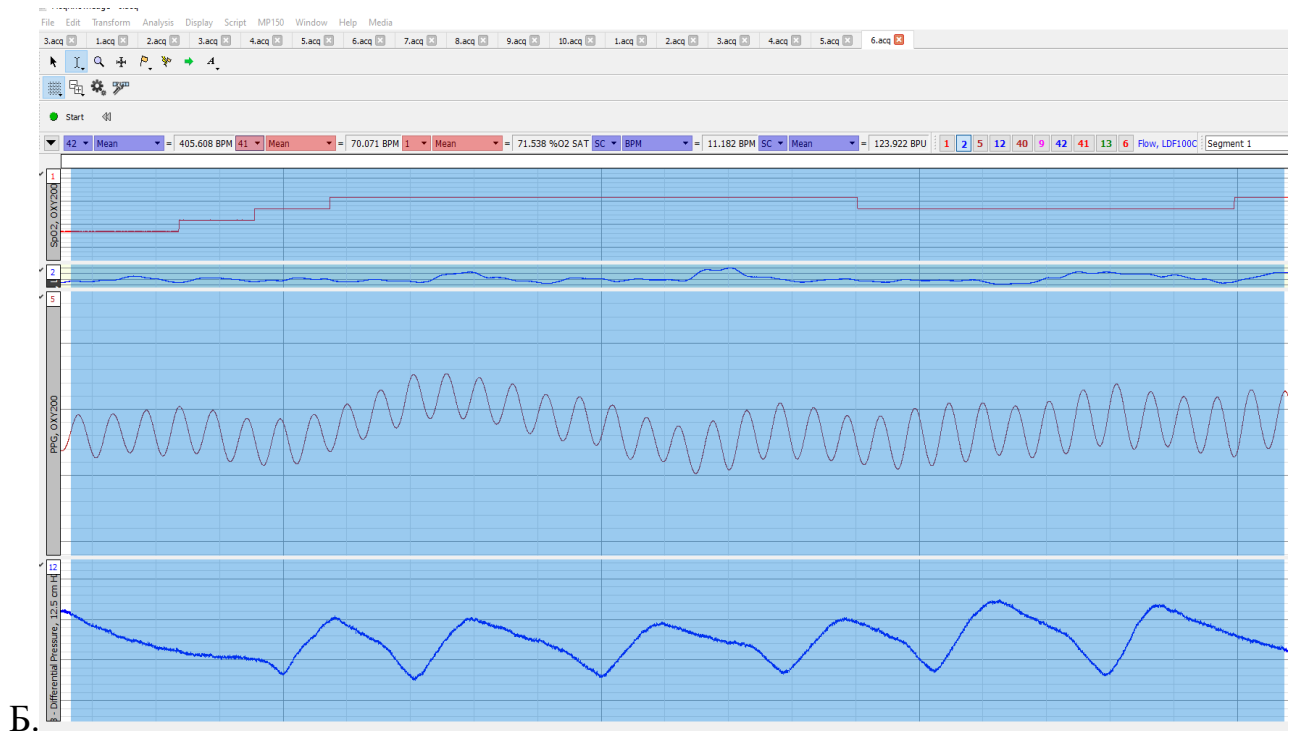
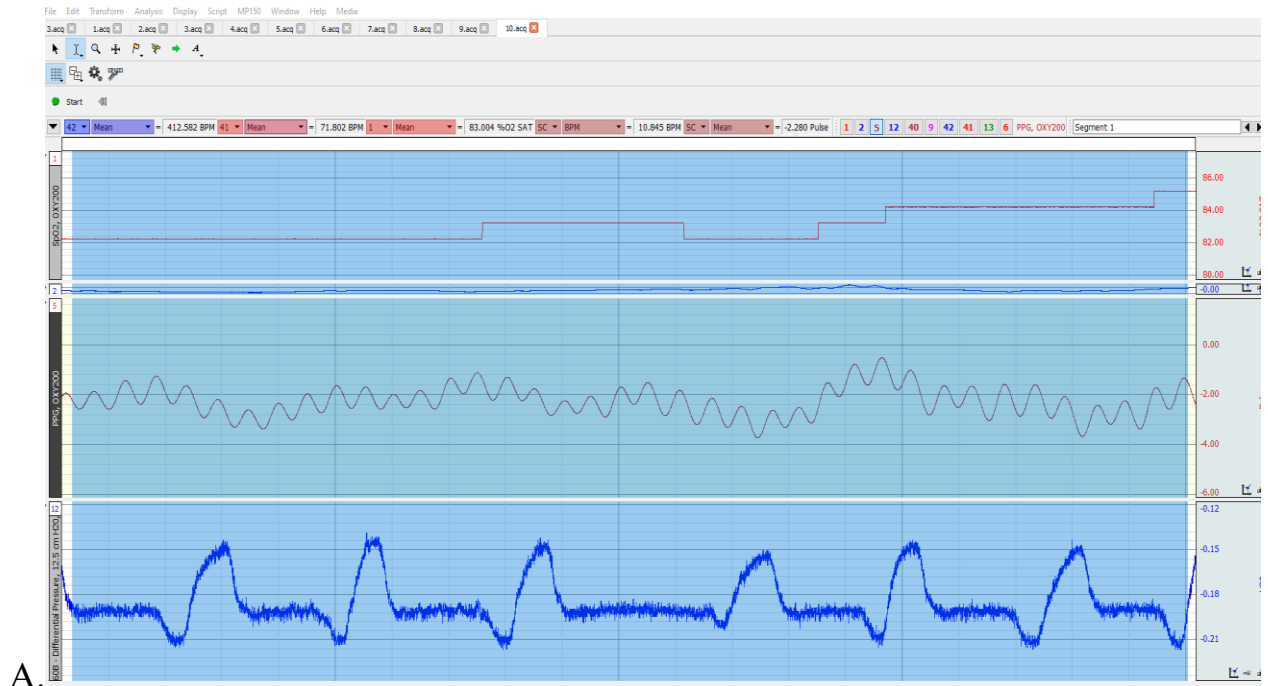


Рисунок 6. Паттерны сердечного ритма и дыхания у лабораторных животных групп групп с гипокинезией и комбинированным стрессом в хроническом периоде. А – на 21 сутки исследования в группе с гипокинезией. Б – на 21 сутки исследования в группе с комбинированным стрессом. Кривая красного цвета – сердцебиение, синего цвета – дыхание.

Подтверждением полученных данных и достоверности сформулированной гипотезы является анализ показателя сатурации у лабораторных животных на протяжении 21 суток исследования.

*Изменение показателя сатурации SpO<sub>2</sub> у лабораторных животных.*

На протяжении исследования, у животных, находившихся в *длительной гипокинезии*, зарегистрировано значительное снижение показателя сатурации. Так, на 7 и 14 сутки исследования в группе самцов значения данного показателя существенно не отличаются (табл. 6). К 21 суткам исследования уменьшение значений SpO<sub>2</sub> снижается на 10,2% и достигает уровня статистической значимости ( $p < 0,05$ ), относительно значений данного показателя, которые получены у самцов этой группы в первые сутки исследования (табл. 6.)

Таблица 6. Значения показателя сатурации у лабораторных животных под влиянием длительного гипокинетического и комбинированного стресса

Группа	Гипокинетический стресс		Гипокинетический + алиментарный стресс (комбинированный стресс)	
	самки	самцы	самки	самцы
Длительность эксперимента				
1 сутки (контроль, фон)	93,3±1,5	87,8±2,1	86,3±1,6	87,8±2,3
7 сутки (острый стресс)	85,8±3,6 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	89,3±1,2	85,7±2,5	83,3±3,4
14 день (подострый стресс)	86,9±3,8	84,5±4,2	79,9±1,6 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	86,9±2,5
21 день (хронический стресс)	80,9±2,0 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	79,0±2,4 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>	75,5±0,7 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2</sub>&lt;0,05</b>	71,4±4,3 <b>p<sub>1</sub>&lt;0,05</b>

*Примечание:* p<sub>1</sub> – достоверность различий по критерию Манна Уитни относительно значений, полученных в первые сутки исследования и в контроле; p<sub>2</sub> – при сравнении изолированного гипокинетического и комбинированного стресса.



У самок, которые также находились в условиях ограниченного движения, на 7 сутки исследования зарегистрировано достоверное снижение показателя SpO<sub>2</sub> на 8,0% ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что на 14 сутки значения показателя SpO<sub>2</sub> увеличилась на 6,9% ( $p > 0,05$ ), но это изменение не достигло уровня статистической значимости. На 21 сутки исследования данный показатель достиг уровня статистической значимости, снизившись на 13,3% ( $p < 0,05$ ), относительно значений SpO<sub>2</sub> в первые сутки эксперимента у животных данной группы и контроля (табл. 6).

Как и в опытах по изучению ЧСС и ЧДД, исследование данных SpO<sub>2</sub> в группе с изолированным *алиментарным стрессом* (ограничением питания) не вызвало значимых изменений.

В условиях длительного *гипокинетического стресса и ограниченного питания*, у животных на протяжении исследования зарегистрированы аналогичные изменения значений показателя SpO<sub>2</sub>. Так, у самцов данной группы на 7 сутки эксперимента отмечено, что данный показатель снизился на 5,1% ( $p > 0,05$ ), но к 14 суткам значения SpO<sub>2</sub> имеют недостоверное снижение на 1,0% ( $p > 0,05$ ) (табл. 6). Отметим, что на 21 сутки показатель SpO<sub>2</sub> был наименьшим и его снижение составило 18,7% ( $p < 0,05$ ), относительно значений данного показателя у самцов этой же группы в первый день эксперимента.

Самки, которые также находились в условиях длительного ограничения питания и в условиях ограниченной двигательной деятельности, имеют аналогичную динамику к снижению значений SpO<sub>2</sub> на протяжении исследования. Так, на 7 сутки эксперимента зарегистрировано, что значения показателя SpO<sub>2</sub> практически не меняется. (табл. 6). Однако на 14 сутки, а также на 21 сутки зарегистрировано достоверное снижение SpO<sub>2</sub>, соответственно, на 7,4% ( $p < 0,05$ ) и 12,5% ( $p < 0,05$ ), относительно значений данного показателя в первые сутки исследования у животных данной группы (табл. 6).

Известно, что на уровне физиологических процессов стресс сопровождается развитием гипоксии, о чем свидетельствует значительное снижение значений показателя сатурации. Так, при сильном сродстве молекулы гемоглобина и

кислорода уменьшается передача последнего тканям организма. Кроме того, недостаток химических веществ в пище вызывает сдвиги функционального состояния, которые могут быть причиной развития нарушений кислотно-щелочного баланса. Результаты, полученные нами, свидетельствуют о том, что гипокинетический стресс, а также комбинация гипокинетического стресса и ограничения питания, могут приводить и к значительным сдвигам гомеостаза на уровне метаболических процессов и кислотно-щелочного равновесия.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что гипокинетический стресс как при нормальном питании, так и при ограниченном питании, оказывает существенный эффект на кардио-респираторную систему, что выражается в увеличении ЧСС на фоне снижения частоты и глубины дыхания, а также снижением процентного содержания кислорода в крови лабораторных животных данных групп (табл. 6). Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что изменения параметров кардиореспираторной системы зарегистрированы у животных обеих групп уже в остром и подостром периоде (7 и 14 суток), однако максимальные изменения всех изученных показателей зарегистрированы на 21 сутки исследования.

*Различия показателей кардиореспираторной системы у животных групп с изолированным гипокинетическим и комбинированным (гипокинетическим и алиментарным) стрессом.*

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о значительных различиях в динамике всех изученных показателей в разных группах животных, находившихся в условиях гипокинетического стресса, как на фоне нормального питания, так и при ограниченном питании. Отметим, что на 21 сутки исследования нами зарегистрированы достоверные различия между исследуемыми показателями кардиореспираторной системы (рис. 7-9, табл. 4-6 для ЧСС, ЧДД и SpO<sub>2</sub> соответственно).

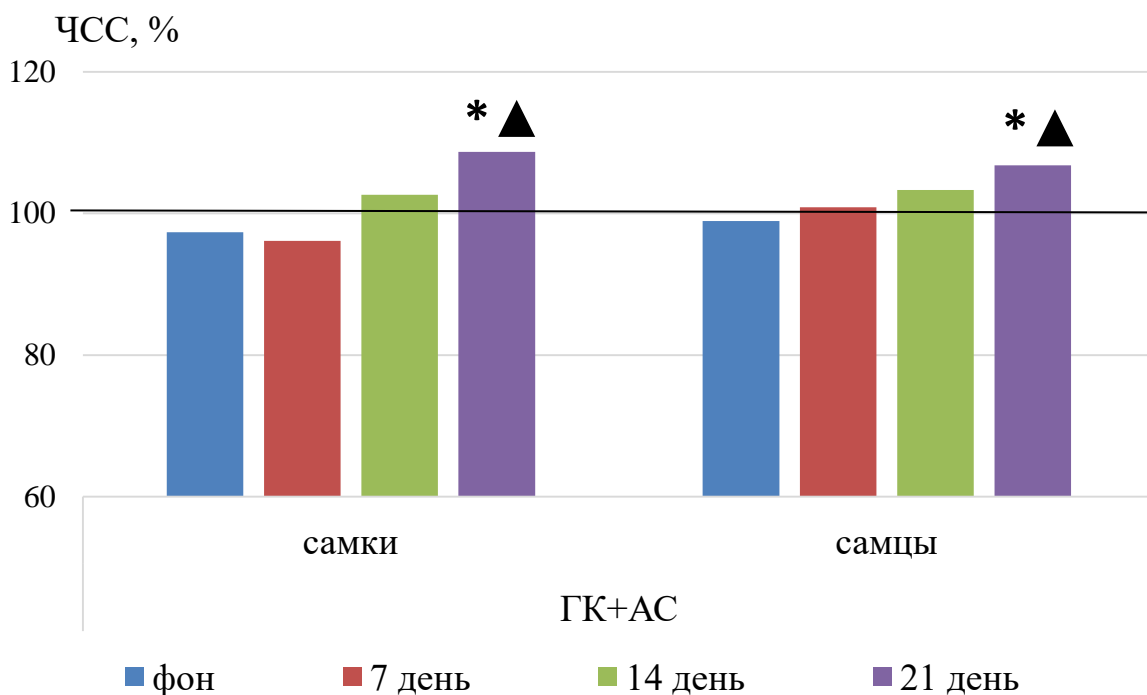


Рисунок 7. Динамика изменения значений показателя ЧСС у лабораторных животных под влиянием длительного комбинированного стресса (гипокинезия с ограничением питания) в %, относительно значений, полученных в группе изолированной гипокинезии, принятых за 100%.

*Примечание:* ГК+АС – комбинированный (гипокинетический+алиментарный) стресс; \* – достоверность различий по критерию Манна Уитни относительно значений, полученных в первые сутки исследования; ▲ – относительно значений при сравнении изолированного гипокинетического и комбинированного стресса.

Так на 21 сутки исследования у самцов группы комбинированного стресса увеличивается значение показателя ЧСС на 6,8% ( $p < 0,05$ ), и наблюдается тенденция к снижению ЧДД и SpO<sub>2</sub> на 1,4% ( $p > 0,05$ ) и 9,6% ( $p > 0,05$ ) соответственно, а у самок этой группы данные изменения достигают уровня статистической значимости и составляют ЧСС – 108,7% ( $p < 0,05$ ), ЧДД – 93,6 % ( $p < 0,05$ ), SpO<sub>2</sub> – 93,3% ( $p < 0,05$ ), относительно значений, полученных в эти сутки исследования в группе с изолированной гипокинезией (рис. 7, табл. 4).

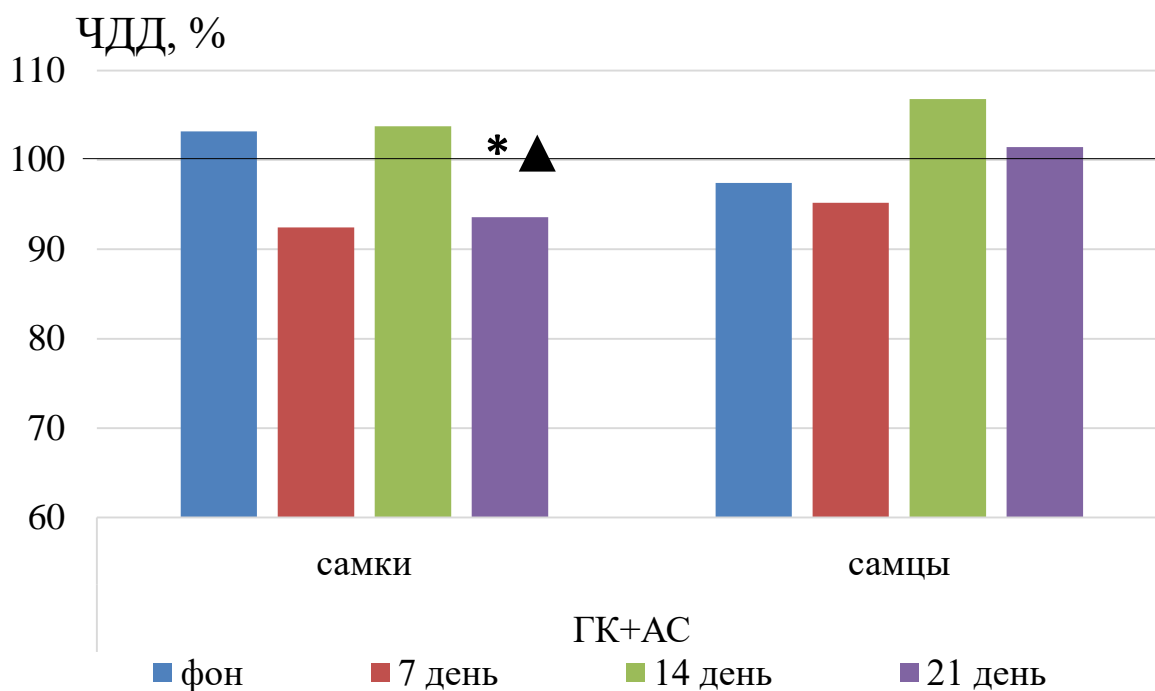


Рисунок 8. Динамика изменения значений показателя ЧДД у лабораторных животных под влиянием длительного гипокINETического и комбинированного стресса (гипокИнезия с ограничением питания) в %, относительно значений, полученных в группе изолированной гипокИнезии, принятых за 100%.

*Примечание:* ГК+АС – комбинированный (гипокИнетический+алиментарный) стресс; \* – достоверность различий по критерию Манна Уитни относительно значений, полученных в первые сутки исследования; ▲ – относительно значений при сравнении изолированного гипокИнетического и комбинированного стресса.

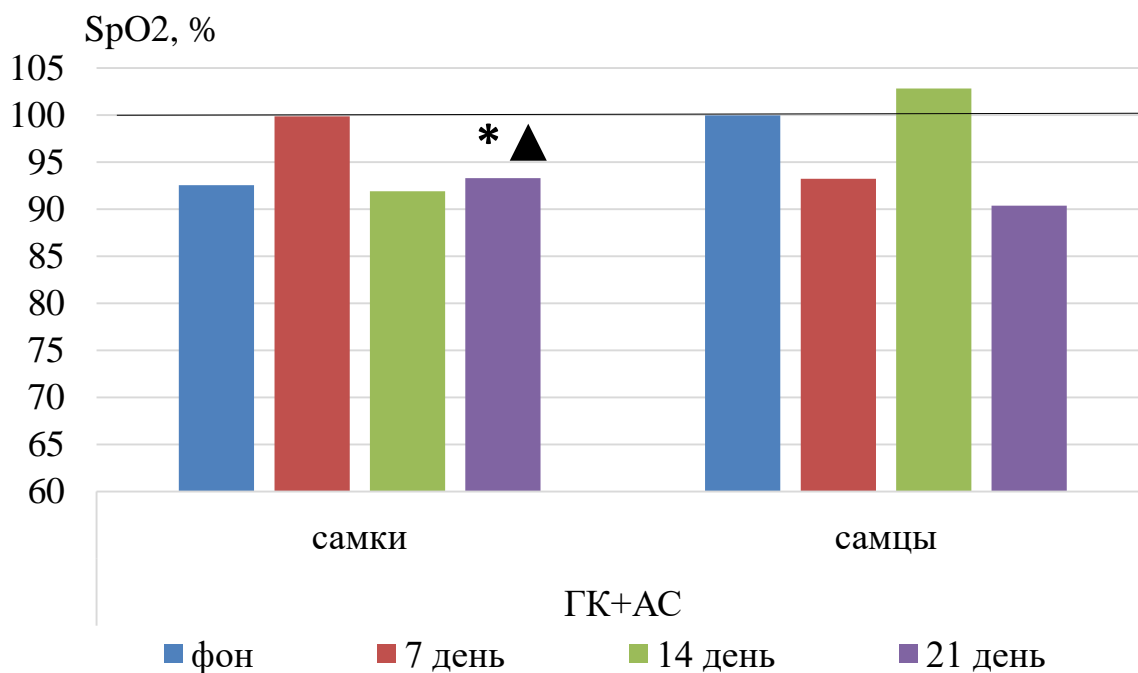


Рисунок 9. Динамика изменения значений показателя SpO<sub>2</sub> у лабораторных животных под влиянием длительного гипокинетического и комбинированного стресса (гипокинезия с ограничением питания) в %, относительно значений, полученных в группе изолированной гипокинезии, принятых за 100%.

*Примечание:* ГК+АС – комбинированный (гипокинетический+алиментарный) стресс; \* – достоверность различий по критерию Манна Уитни относительно значений, полученных в первые сутки исследования; ▲ – относительно значений при сравнении изолированного гипокинетического и комбинированного стресса.

Таким образом, 21-дневное воздействие ГК стресса как монофактора, так и его комбинации с алиментарным стрессом (в условиях длительного ограничения питания), оказывает значимый патогенный эффект на показатели кардиореспираторной системы у лабораторных животных, что выражается в увеличении ЧСС на фоне снижения частоты и глубины дыхания, а также снижением процентного содержания кислорода в крови крыс как мужского, так и женского пола. Данные полученные нами у лабораторных животных группы с комбинированным стрессом свидетельствуют о том, что ограниченное питание усиливает действие гипокинетического стресса, а изменения показателей

сердечно-сосудистой системы на протяжении курсового ограничения подвижности и питания в большей степени выражены в группе самок. Следовательно, согласно результатам исследования система регуляции функций дыхательного и сердечно-сосудистого комплекса самок оказалась более чувствительной к условиям дефицита питания.

*Выводы подраздела:*

1. 21-дневное воздействие гипокинетического стресса как на фоне нормального питания, так и при длительном ограничении питания, оказывает выраженный эффект на показатели кардиореспираторной системы у лабораторных животных, что выражается в увеличении ЧСС на фоне снижения частоты и глубины дыхания, а также в снижении процентного содержания кислорода в крови самцов и самок крыс.

2. Изменения параметров кардиореспираторной системы зарегистрированы у лабораторных животных обеих групп уже с 7 суток исследования, однако максимальные изменения всех изученных показателей зарегистрированы на 21 сутки. В группе самцов и самок с гипокинезией на 21 сутки исследования зарегистрировано достоверное увеличение значения показателя ЧСС: на 8,0-10,3% ( $p < 0,05$ ); а также снижение значений показателей ЧДД и SpO<sub>2</sub> на 22,4-23,1% ( $p < 0,05$ ) и 10,2-13,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно. В этой группе более выражены изменения по всем показателям – у самок.

3. В группе с комбинированным стрессом в эти сроки зарегистрировано увеличение ЧСС на 16,4-23,1% ( $p < 0,05$ ), а также снижение ЧДД и SpO<sub>2</sub> на 19,0-30,0% ( $p < 0,05$ ), 12,5-18,7% ( $p < 0,05$ ) соответственно, относительно значений этих показателей в первые сутки исследования. В группе с комбинированным стрессом показатели ЧСС и ЧДД больше меняются у самок, а SpO<sub>2</sub> – у самцов.

4. Гипокинетический стресс на фоне ограничения питания усиливает патологические изменения в кардиореспираторной системе у животных группы комбинированного воздействия стресса и приводит к максимальному увеличению показателей ЧСС, а также максимальному снижению значений показателей ЧДД и SpO<sub>2</sub> под воздействием длительного применения данного фактора.

5. При сравнении эффектов изолированной гипокинезии и ее комбинации с ограничением питания, на 21 сутки исследования у самцов увеличиваются значения показателя ЧСС на 6,8% ( $p < 0,05$ ), и наблюдается тенденция к снижению ЧДД и SpO<sub>2</sub> на 1,4% ( $p > 0,05$ ) и 9,6% ( $p > 0,05$ ) соответственно, а у самок данные изменения достигают статистической значимости и составляют по ЧСС –8,7% ( $p < 0,05$ ), ЧДД – 6,4 % ( $p < 0,05$ ), и SpO<sub>2</sub> – 6,7% ( $p < 0,05$ ). Данные параметры указаны относительно значений, полученных в эти сутки исследования в группе с гипокинетическим стрессом.

### 3.3. Динамика гематологических показателей

#### *Изменение лейкоцитарной формулы крови у лабораторных животных.*

Видовой особенностью крови крыс в норме является высокое содержание лейкоцитов (вдвое больше, чем у человека) и лабильность этого показателя в ответ на воздействия (в нашей работе содержание лейкоцитов менялось от  $10,5 \pm 0,9 \cdot 10^9/\text{л}$  до  $2,6 \pm 0,4 \cdot 10^9/\text{л}$  у самцов и  $11,1 \pm 1,4 \cdot 10^9/\text{л}$  до  $2,4 \pm 0,3 \cdot 10^9/\text{л}$  у самок, более чем в 4 раза (табл. 7). В крови есть гранулированные лейкоциты (содержат нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулы при окраске по методу Романовского-Гимзы) и агранулоциты: лимфоциты и моноциты. Гематологический анализатор определяет эти клетки по размерам и физическим параметрам. Мазки мы делали для контроля прибора и исследования лейкоцитарной формулы. Среди клеток белой крови крыс лимфоциты являются преобладающей популяцией. Нейтрофилы в подавляющем большинстве имеют сегментированные ядра и редко формы изогнутой палочки и кольцевидные. Эозинофилов мало, они имеют палочковидные светлые ядра и яркие оранжево-розовые гранулы. Базофилы являются крайне редкой находкой – это мелкие клетки, густо заполненные мелкими гранулами черного цвета, закрывающими ядро. Моноциты, напротив, крупные, имеют многолопастное ядро и цитоплазму с светлыми дымчато-синими включениями и вакуолями.

Таблица 7. Параметры белой крови у лабораторных животных под влиянием гипокинетического и комбинированного стресса (по данным геманализатора)

Показатели	Исследуемая группа, длительность эксперимента							
	изолированный стресс				комбинированный стресс			
	1 сутки (контроль фон)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)	1 сутки (3 недели алимент. стресса)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)
<b>самцы</b>								
WBC *10 <sup>9</sup> /л	10,5±0,9	9,3±0,9	9,3±1,0	8,7±0,8	6,1±0,7 ●	8,4±1,4	3,0±0,3 *●	2,6±0,4 *●
LYM *10 <sup>9</sup> /л	8,3±0,8	6,5±0,7	6,6±1,1	6,4±0,6	4,0±0,3 ●	4,6±0,7	1,2±0,3 *●	1,2±0,3 *●
MON *10 <sup>9</sup> /л	1,5±0,2	1,8±0,2	1,6±0,3	1,6±0,1	1,5±0,2	2,1±0,4	0,8±0,1 *●	0,6±0,1 *●
GRA *10 <sup>9</sup> /л	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2	0,7±0,1	0,6±0,2	1,7±0,3 *●	0,9±0,2	0,8±0,2
LYM %	79,3±1,5	72,4±2,3 *	75,0±1,8	72,7±1,0 *	68,0±3,0 ●	56,0±2,4 *●	38,6±7,1 *●	43,0±6,4 *●
MON %	13,9±0,7	19,5±1,8 *	17,8±1,1 *	19,2±1,1 *	22,6±1,2 ●	24,2±1,4	28,3±3,8 ●	29,1±4,1 ●
GRA %	6,8±1,0	8,2±0,7	7,2±1,0	8,1±1,1	9,3±2,2	19,8±1,7 *●	33,1±4,9 *●	30,3±4,1 *●
л/г	<b>11,5</b>	<b>9,0</b>	<b>9,3</b>	<b>8,7</b>	<b>6,4</b>	<b>2,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,5</b>
<b>самки</b>								
WBC *10 <sup>9</sup> /л	11,1±1,4	7,1±0,6*	5,4±0,5 *▲	4,6±0,3 *▲	5,1±0,6 ●	5,5±0,7	2,5±0,3 *●	2,4±0,3 *●
LYM *10 <sup>9</sup> /л	8,8±1,2	5,2±0,5*	3,4±0,4 *▲	2,7±0,3 *▲	4,3±0,6 ●	3,7±0,6	1,3±0,2 *●	1,2±0,2 *●
MON *10 <sup>9</sup> /л	1,4±0,2	1,4±0,2	1,1±0,1	1,0±0,1 *▲	0,7±0,0 ●▲	1,1±0,1 *▲	0,6±0,1 ●	0,6±0,1 ●
GRA *10 <sup>9</sup> /л	0,9±0,2	0,7±0,2	0,8±0,1	1,0±0,1	0,2±0,0 ●	0,7±0,1 *▲	0,6±0,1 *●	0,6±0,1 *●
LYM %	78,7±1,3	71,6±1,9 *	62,9±2,8 *▲	58,2±3,4 *▲	81,8±1,7 ▲	66,7±3,0 *▲	53,4±1,8 *●	50,6±2,1 *
MON %	13,1±1,1	19,0±0,9 *	21,3±2,0 *	21,4±2,3 *	13,8±1,2 ▲	20,2±1,3 *	24,4±1,1 *	24,7±2,2 *
GRA %	8,2±0,5	9,4±1,4	15,8±1,1 *▲	20,4±2,0 *▲	4,4±0,7 ●	13,1±1,8 *▲	22,2±1,5 *●	24,7±2,9 *
л/г	<b>9,6</b>	<b>7,8</b>	<b>4,1</b>	<b>2,9</b>	<b>22,5</b>	<b>5,4</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>

Примечания: WBC – общее число лейкоцитов; LYM – лимфоциты, MON – моноциты, GRA – гранулоциты – в абсолютных цифрах и в процентах (\*10<sup>9</sup> клеток/литре, %), л/г – соотношение лимфоциты/гранулоциты.

Достоверность при p≤0,05: \* - достоверно по отношению к 1 суткам; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ - к группе крыс противоположного пола.



Показатели изучали при остром, подостром и хроническом изолированном и комбинированном стрессе, определяли временные и половые отличия показателей. В таблице выделены полужирным шрифтом данные коэффициента л/г. Это подобие индекса Гаркави, предложенного для регистрации стадий стресса. Как уже мы упоминали в разделе 2, индекс Гаркави – это отношение процента лимфоцитов к проценту сегментоядерных нейтрофилов (л/нс). В связи с особенностями детекции прибором клеток крысы, он несколько завышает процентное содержание моноцитов. В связи с этим, а также в связи с необходимостью рассчитывать индекс соотношения лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов (которые не выделяет геманализатор экспериментальной лаборатории), мы также проводили классическую микроскопию и обсчет мазка, окрашенного по методу Романовского-Гимзы (по линии меандра вручную в области «щеточки»), в том числе и для контроля аппаратного метода. Он показал аналогичную прибору тенденцию, но классическую картину относительного содержания нейтрофилов и моноцитов, а также мы определили лейкоцитарную формулу (табл. 8). Поскольку прибор аттестован для подсчета клеток крови млекопитающих, а методика ручного анализа мазка отличается от автоматического подсчёта (сублигвальный разрез и помещение в пробирку с ЭДТА при анализе на геманализаторе и капля периферической крови, полученная из мелких сосудов хвоста, сразу нанесенная на стекло) считаем правомочными результаты обеих методик, дополняющих одна другую.

По данным гематологического анализатора показатели лейкоцитарной формулы, как самок, так и самцов без дефицита питания в начале эксперимента такие: в процентном отношении доминируют лимфоциты 78-79% и моноциты 13%; а гранулоциты составляют наименьшую по численности популяцию – 7-8%. Что соответствует нормальным величинам отдельных гематологических показателей и характерно для лабораторных животных, в том числе для белых крыс, и упоминается в работах многих отечественных и зарубежных исследователей [155-163].

Таблица 8. Параметры белой крови у лабораторных животных под влиянием гипокинетического и комбинированного стресса (при ручном подсчете)

Содержание клеток крови, %	Исследуемая группа, длительность эксперимента							
	изолированный стресс				комбинированный стресс			
	1 сутки (контроль фон)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)	1 сутки (3 недели алимент. стресса)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)
<b>самцы</b>								
Палоч.	2,8±0,5	0,5±0,2 *	2,7±1,2	2,8±0,9	2,3±0,5	1±0,4	1,5±0,5	2,0±0,8
Сегм.	14,3±2,1	17,7±4,2	23,8±3,3 *	28,3±6,0 *	23,7±2,9	23,2±1,9	26,5±3,3	37,0±0,9 ●*
Эозин.	1,7±0,4	1,7±0,7	4,3±1,1	8,5±3,5	1,2±0,5	0,7±0,4	2,5±0,2 ●	3,7±0,7 *●
Базоф.	0,5±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,2
Моноц.	2,5±0,5	2,0±0,6	6,0±1,1 *	7,5±1,4 *	3,2±0,8	5,7±1,3	3,7±0,5	8,0 ±2,7
Лимф.	78,2±2,8	78,2±4,2	63,2±4,5	52,8±5,6 *	69,7±3,2	69,5±2,7	65,8±3,8	49,2±3,8 *
л/нс	<b>5,5±0,3</b>	<b>7,0±2,9</b> *	<b>2,9±0,5</b>	<b>2,9±1,2</b> *	<b>3,3±0,6</b>	<b>3,1±0,3</b> ●	<b>2,9±0,9</b>	<b>1,3±0,1</b> *
<b>самки</b>								
Палоч.	1,0±0,4 ▲	0,3±0,2	1,3±0,6	1,5±0,2	0,7±0,2 ▲	0,8±0,3	2,7±0,8	2,0±0,7
Сегм.	14,7±1,2 ▲	10,5±1,8	20,2±1,5*	29,3±2,0 *	16,3±0,9	17,5±1,3 ●	28,8±1,5 *●	46,7±4,9 ●*
Эозин.	3,0±0,6	0,8±0,4*	0,8±0,3 *▲	1,8±0,7	1,0±0,4	1,0±0,6	1,0±0,3 ▲	1,8±0,8
Базоф.	0,3±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Моноц.	3,0±0,9	4,5±0,8	4,2±0,8	6,7±0,5 *	4,2±0,8	5,7±1,5	4,8±1,2	3,7±1,3
Лимф.	78,0±2,1 ▲	83,8±1,9	73,5±2,4	60,7±2,9 *	77,8±1,4	75,0±0,8 ●	62,7±1,9 *●	45,8±4,8 ●*
л/нс	<b>5,5±0,6</b> ▲	<b>9,4±2,2</b> *	<b>3,8±0,5</b>	<b>2,1±0,2</b> *	<b>4,8±0,3</b> *	<b>4,4±0,3</b> ▲	<b>2,2±0,2</b> *●	<b>1,1±0,2</b> *●

*Примечания:* Клетки крови: палоч. – палочкоядерные нейтрофилы; сегм. – сегментоядерные нейтрофилы; эозин. – эозинофилы; базоф. – базофилы; моноц. – моноциты; лимф. – лимфоциты; л/нс – соотношение лимфоциты/нейтрофилы сегментоядерные.

Достоверность при  $p \leq 0,05$ : \* - достоверно по отношению к 1 суткам; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ - к группе крыс противоположного пола.

1 сутки комбинированного стресса соответствует 3 неделям алиментарного стресса, который действовал мягче, его не изучали в динамике, а только в финальной стадии – в конце 3 недели (1 сутки (начало) комбинированного стресса = 3 недели (финал) алиментарного стресса).

У самок при алиментарном стрессе лейкоцитов значимо меньше, а формула не изменена. У самцов трехнедельная диета также вызывает лейкопению в 1,7 раз в сравнении с нормальным питанием, что несколько меньше, чем у самок.

*После первой недели* стрессирования ограничением подвижности, у самок и самцов на нормальном питании значительных изменений в лейкоцитарной формуле нет. Однако отмечается общее снижение лейкоцитов.

При комбинированном стрессе отмечается повышение общего количества лейкоцитов и начинает развиваться лимфопения, с ростом моноцитов и гранулоцитов. Что, по-видимому, обусловлено более ранней реакцией на стресс.

*На второй неделе* стрессирования выявлены следующие изменения: у самок продолжает нарастать лейкопения, при продолжающемся снижении содержание лимфоцитов. Соответственно, изменились и показатели в процентном соотношении: уменьшение лимфоцитов при росте процентного содержания моноцитов и гранулоцитов. У самок при комбинированном стрессе изменения более выражены. В четыре раза от исходных цифр уменьшается количество лейкоцитов, усугубляется лимфопения. Помимо этого, увеличилось содержание гранулоцитов.

У самцов без дефицита питания существенных изменений не выявлено. В то время как у самцов с комбинацией иммобилизации с алиментарным стрессом мы наблюдаем значимые изменения: уменьшается количество лейкоцитов, понижается процентное содержание лимфоцитов, растет моноцитоз, гранулоцитоз. Реакция самцов на комбинированный стресс более выражена, в сравнении с самцами на фоне нормального питания.

*В конце третьей недели* у самок при монофакторном и комбинированном стрессе изменения схожи с предыдущим этапом, выявлено усиление лейкопении, причем показатели группы с гипокинетическим стрессом в два раза отличаются от

группы с комбинацией гипокинезии и ограничения питания. Также более выражены изменения в лейкоцитарной формуле крыс с комбинированным стрессом в уменьшении процентного содержания лимфоцитов, на фоне нарастающего гранулоцитоза.

У самцов при гипокинезии нет резких изменений показателей в сравнении со второй неделей. А у самцов с комбинацией фиксации и дефицита питания изменения более выражены: общее количество лейкоцитов продолжает уменьшаться, нарастает лимфопения, снижается количества лимфоцитов и растет гранулоцитоз.

Если провести сравнение самцов и самок, то можно заметить, что, судя по показателям лейкоцитарной формулы крови, самцы более устойчивы к гиподинамическому стрессу в виде монофакторного испытания, так мы видим, что коэффициент «л/нс» до стрессирования у самцов и у самок практически сходен (у самок несколько ниже). На второй неделе стрессирования коэффициент у самок становится более низким по сравнению с самцами. На 3 неделе стрессирования у самок он значительно падает до критических цифр, в то время как у самцов он изменяется умеренно.

У крыс, подвергшихся комбинированному стрессу, развивается наиболее выраженная стресс-реакция. Так, у самок на 3 неделе индекс соотношения лимфоциты/гранулоциты равен  $2,4 \pm 1,15$ . У самцов этот индекс равен на 2 неделе  $1,16 \pm 1,58$ , а на третьей  $1,42 \pm 1,58$ . Индекс Гаркави (соотношение лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы при ручном подсчете) аналогично прогрессивно снижается с 7 по 21 сутки испытания комбинированным стрессом (табл. 7 и 8).

Таким образом, иммобилизационный и алиментарный стресс-факторы вызывают в составе крови ряд изменений, которые можно рассматривать как проявление стресс-реакций: падение числа лейкоцитов, увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов, снижение содержания лимфоцитов и изменение индекса стресса.

*Изменение показателей красной крови и тромбоцитов у лабораторных животных.*

Красная кровь и тромбоцитарный рост у крыс в норме не имеют такой видовой специфики, как лейкоцитарная формула, и незначительно отличаются от других млекопитающих. Известно, что количество эритроцитов, тромбоцитов зависит от различных влияний внешней среды, способа, момента и места взятия крови, пищевого режима, возраста животного и других факторов [158-160]. В связи с этим исследования проводили с соблюдением максимальной стандартизации. Изменения красной крови при стрессе также выявили ряд интересных закономерностей (табл. 9).

У самцов при обычном питании через неделю иммобилизации установлен рост количества эритроцитов, гемоглобина и, соответственно, гематокрита. Причем рост показателей более выражен в группе изолированного стресса, чем при комбинированном воздействии, что свидетельствует о снижении адаптационных способностей крови животных, вошедших в эксперимент после трехнедельного ограничения питания. На второй неделе выявлены обратные изменения по вышеупомянутым показателям у самцов: снижается количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита. У самок не происходит значимого изменения показателей красной крови, незначительно увеличивается концентрация гемоглобина в эритроцитах. На третьей неделе, когда стресс носит характер хронического, продолжается отрицательная тенденция (снижение показателей) содержания эритроцитов, гемоглобина и гематокрита у самцов. У самок показатели эритроцитов практически не отличаются от контроля.

При комбинированном стрессе в группе животных с дефицитом питания у самцов лишь на третьей неделе стрессирования заметна значимая разница показателей красной крови: содержание эритроцитов и гемоглобин снижаются. У самок в группе комбинированного стресса через неделю гиподинамии выявлен значимый рост уровня содержания эритроцитов и гемоглобина, сопоставимый с группой изолированного гиподинамического стресса. На сроках второй и третьей недели разницы от исходных значений по эритроцитарным показателям нет.

Таблица 9. Параметры красной крови у лабораторных животных под влиянием гипокинетического и комбинированного стресса (по данным геманализатора)

Показатели	Исследуемая группа, длительность эксперимента							
	изолированный стресс				комбинированный стресс			
	1 сутки (контроль фон)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)	1 сутки (3 недели алимент. стресса)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрониче- ский стресс)
<b>самцы</b>								
RBC *10 <sup>12</sup> /л	5,7±0,2	6,6±0,2 *	4,3±0,4 *	4,1±0,3 *	4,7±0,3 ●	5,0±0,3 ●	3,7±0,3 ▲	3,6±0,3 *▲
HGB г/л	10,9±0,3	12,4±0,5 *	9,1±0,7 *	8,6±0,7 *	10,2±0,7	10,8±0,5	8,2±0,7 ▲	8,0±0,7 *▲
HCT %	27,5±0,7	31,6±1,0 *	24,8±0,7 *	23,6±0,9 *	25,7±1,7	26,5±1,3 ●	20,8±1,7 ●	20,4±1,7
MCV 10 <sup>-15</sup> /л	48,4±0,5	48,8±0,5	53,6±1,0	56,0±0,8	55,3±1,9	52,9±1,0	56,2±1,2	57,3±1,5
MCH пг	19,1±0,3	18,8±0,3	21,6±0,4	23,9±0,5	21,8±0,6	21,4±0,5	22,1±0,4	22,2±0,4
MCHC г/л	39,5±0,5	38,5±0,2	40,3±0,9	40,3±0,6	39,4±0,4	40,7±0,3	39,4±0,6	39,2±0,8
RDWC %	13,2±0,3	12,9±0,2	16,6±0,8	16,7±0,8	19,2±1,1	16,4±0,5	17,6±0,9	17,7±1,0
RDWS 10 <sup>-15</sup> /л	27,4±0,6	27,6±0,7	40,0±2,3	42,4±1,7	41,2±2,8	34,9±1,1	41,4±3,0	41,7±3,2
<b>Самки</b>								
RBC *10 <sup>12</sup> /л	4,3±0,4	4,7±0,3	5,0±0,2	5,0±0,2	4,2±0,3	5,6±0,2 *●	4,7±0,3	4,7±0,3
HGB г/л	9,3±0,7	10,2±0,8	11,0±0,3	11,2±0,6	8,9±0,4	11,8±0,4 *	11,3±0,6	11,0±0,6
HCT %	24,6±2,0	26,4±2,0	27,0±0,7	27,0±0,9	22,4±1,0	28,7±1,0	25,2±1,3	24,9±1,4
MCV 10 <sup>-15</sup> /л	57,3±2,8	54,6±1,2	54,6±0,8	54,7±0,7	53,1±1,6	51,6±1,0	53,4±0,8	53,4±0,8
MCH пг	21,7±0,8	21,3±0,4	22,3±0,3	22,8±0,3	21,3±0,6	21,1±0,4	24,3±1,9	24,5±1,9
MCHC г/л	38,2±0,5	38,7±0,3	40,8±0,6	41,3±0,8	40,2±0,3	41,0±0,2	45,7±3,8	46,2±3,7
RDWC %	17,3±0,8	17,3±0,6	16,4±0,6	16,5±0,5	19,2±0,9	15,8±0,4	15,1±0,2	14,9±0,2
RDWS 10 <sup>-15</sup> /л	40,7±2,6	36,0±1,6	34,9±1,4	35,3±1,2	40,1±2,1	31,7±0,9	31,7±0,5	31,6±0,5

Примечания: RBC – число эритроцитов; HGB – гемоглобин; HCT – гематокрит, MCV – средний объем эритроцита; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах; RDWC и RDWS – степень разброса эритроцитов по объему, маркеры анизоцитоза.

Достоверность при  $p \leq 0,05$ : \* - достоверно по отношению к 1 суткам; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ - к группе крыс противоположного пола.

Если провести сравнение между самцами и самками можно выявить, что самцы более подвержены анемическому состоянию: параметры количества эритроцитов и концентрации гемоглобина на 2-3 неделе стрессирования у них ниже по сравнению с самками. Данная тенденция наблюдается как в группе стрессированных в условиях нормального питания, так и в группе алиментарного и йод-дефицитного питания.

При гиподинамическом стрессе изначально количество эритроцитов возрастает (1 неделя), это возможно лишь в первую фазу стресса – мобилизацию, эти результаты соответствуют литературным данным [162]. Затем содержание красных кровяных клеток, уровень гемоглобина и гематокрита понижается (2-3 неделя стресса). Это важно для понимания и интерпретации патофизиологических процессов, происходящих в органах.

*Изменение показателя тромбоцитов крови у лабораторных животных.*

В группе животных с обычным питанием выявлен ряд закономерных изменений при стрессе (табл.10). У самцов через неделю стрессирования наблюдается значительный рост числа тромбоцитов и тромбокрита, уменьшается коэффициент больших тромбоцитов. У самок есть подобная тенденция по количеству тромбоцитов. На второй неделе выявлены обратные изменения по вышеупомянутым показателям у самцов: продолжается снижение количества тромбоцитов. У самок не происходит значимого изменения показателей тромбоцитов. На третьей неделе, когда стресс носит характер хронического, остаются сниженными показатели тромбоцитов у самцов. У самок показатели тромбоцитарного компонента гемограммы продолжают снижаться менее критично, нежели у самцов.

В группе животных с дефицитом питания у самок наблюдается рост по тромбоцитарным показателям, в то время как у самцов очень незначительное падение. Если провести сравнение внутри групп животных одного пола, то при различных нутриентных статусах, по показателям тромбоцитов наблюдаем следующую тенденцию: количество тромбоцитов больше в группах, подвергшихся сочетанному стрессированию.

Таблица 10. Параметры тромбоцитов у лабораторных животных под влиянием гипокинетического и комбинированного стресса (по данным геманализатора)

Показатели	Исследуемая группа, длительность эксперимента							
	изолированный стресс				комбинированный стресс			
	1 сутки (контроль фон)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хронический стресс)	1 сутки (3 недели алимент. стресса)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хронический стресс)
<b>самцы</b>								
PLT 10 <sup>9</sup> /л	267±39,6	405,8± 40,9*	224,7±41,9	216,5± 35,7	413,0± 36,3●	434,5± 41,6●	373,7± 36,9●	362,6± 37,5●
MPV 10 <sup>-15</sup> /л	5,6±0,1	5,1±0,2	6,2±0,3	6,2±0,3	5,2±0,1	5,4±0,3	5,4±0,4	5,3±0,2
PCT %	0,1±0,0	0,2±0,0 *	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
PDW 10 <sup>-15</sup> /л	21,9±2,2	17,5±0,8	15,6±1,6	15,0±1,4	13,5±1,5	12,4±0,6	9,2±0,4	9,2±0,5
PLCR %	5,5±0,8	2,8±0,3 *	9,3±2,2	8,5±1,4	4,2±0,5	5,5±1,7	6,2±1,9	5,0±0,8
<b>самки</b>								
PLT 10 <sup>9</sup> /л	185,1± 22,8	329,6± 16,9*	261,1± 31,4	235,1± 27,6	307,1± 27,2●	350,3± 29,5	384,9± 28,7●	391,4± 29,2●
MPV 10 <sup>-15</sup> /л	6,5±0,3	5,6±0,3	6,0±0,2	5,9±0,3	5,3±0,1	5,4±0,1	4,9±0,1	4,8±0,1
PCT %	0,1±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
PDW 10 <sup>-15</sup> /л	15,3±1,2	25,4±13,3	13,6±1,0	14,0±1,1	15,3±1,9	15,6±1,1	10,3±0,5	9,8±0,6
PLCR %	9,6±1,3	6,0±1,0	7,5±1,1	7,4±1,1	4,5±0,5	4,7±0,7	3,4±0,4	3,2±0,4

*Примечания:* PLT – общее число тромбоцитов; MPV – средний объем тромбоцитов, PCT – тромбокрит, относительная ширина распределения тромбоцитов по объему; PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, PLCR – процент гигантских тромбоцитов

Достоверность при  $p \leq 0,05$ : \* - достоверно по отношению к 1 суткам; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ - к группе крыс противоположного пола.

Выводы подраздела.

1. Показатели белой крови крыс крайне лабильны при трехнедельном гипокинетическом и комбинированном стрессе, прогрессивное снижение коэффициента л/нс – индекса Гаркави (от 5,5 до 1,1-1,3 ед) начинается со второй



недели эксперимента и отражает стадии стресса, показывая успешность модели. Показатели лейкоцитарной формулы при нутритивном дефиците йода и витаминов усугубляются по сравнению с монофакторным гипокинетическим воздействием и характеризуются большей лейкоцитопенией, лимфоцитопенией, гранулоцитозом, увеличением эозинофилов и снижением содержания базофилов.

2. Половые отличия эффектов стрессорного воздействия выявлены в группе с обычным питанием уже в конце второй недели гиподинамии. У самок за счет лейкопении, лимфопении и гранулоцитоза индекс снижается (свойственно реакции активации), а у самцов остается в пределах нормы, что на 69,7% ниже при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ . Данная тенденция сохраняется и в конце третьей недели стресса: индекс у самок ниже на 66,4% при  $p \leq 0,05$ . В группе с комбинацией алиментарного дисбаланса и гиподинамии более чувствительными оказались самцы. Уже в конце первой недели среднее абсолютное значение индекса в группе самцов соответствует реакции активации, значимо (на 51,4% при  $p \leq 0,05$ ) ниже, чем у самок. На второй и третьей неделях показатели индекса у животных обоих полов достигают значения реакции тренировки и стресс-реакции и уже не отличаются между собой, но резко снижены по сравнению с исходными данными в той же группе.

3. Самки особенно тяжело переносят гиподинамию (универсальный стресс для этого вида лабораторных животных), а самцы, достаточно стойкие к ограничению подвижности, резко отрицательно реагируют на нарушения состава питания и их комбинацию с помещением в фиксатор.

3. Показатели красной крови при стрессе характеризуются эритропенией, анемией, тромбоцитозом; у самцов они лабильней, и самцы крайне тяжело переносят комбинированный стресс, провоцирующий выраженный тромбоцитоз, не свойственный изолированному гиподинамическому стрессу. При гиподинамическом стрессе на первой неделе в первую фазу стресса – фазу мобилизации, количество эритроцитов возрастает. Затем содержание эритроцитов, уровень гемоглобина и гематокрита понижается (2-3 неделя). В то время как возрастает количество тромбоцитов в крови.

## ГЛАВА 4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА

### 4.1. Изменение уровня гормонов щитовидной железы и надпочечных желез в сыворотке крови

Щитовидная железа является периферической эндокринной железой и органом-мишенью гипофизарного тиреотропина, является регулятором роста, созревания, обменных процессов, координируя равновесие анаболизма и катаболизма в первую очередь за счет выработки гормона тироксина ( $T_4$ ), уровень которого отражает ее функцию. Мы исследовали уровень свободного тироксина ( $T_4$ ) и тиротропного гормона (ТТГ) в серии экспериментов по моделированию стресса. В этом же разделе для удобства описания и сопоставления приводим данные по уровню кортизола в сыворотке крови крыс.

Тироксин ( $T_4$ ) и трийодтиронин ( $T_3$ ) являются йодтиронинами, синтезируются в тироцитах или высвобождаются из коллоида, из тиреоглобулина в процессе протеолиза под действием ТТГ. Они транспортируются в сыворотке крови в комплексе с тироксинсвязывающим глобулином. Щитовидная железа секретирует преимущественно  $T_4$ , из которого в тканях путем дейодирования образуется большая часть  $T_3$ . Транспортные белки имеют большее сродство к  $T_4$ , они определяют его концентрацию в сыворотке, ограничивают проникновение в клетки и периферический метаболизм. Ядерные рецепторы, напротив, имеют большее сродство к  $T_3$ . Периферические механизмы ауторегуляции его ферментативного катаболизма уравнивают дестабилизирующее центральное действие. Поэтому уровень работы железы определяется преимущественно  $T_4$ .

Уровень трийодтиронина ( $T_3$ ) как правило, очень стабилен внутри популяций крыс, в пределах групп в норме и при экспериментальных воздействиях [131, 139], аналогично мы получили результаты, не отличающиеся между группами (все данные были в пределах 1-2 нг/мл), поэтому мы не

приводим результаты его исследований. Этот гормон отражает скорее запрос периферии, чем функцию железы или регуляторные эффекты аденогипофизарных тиротропоцитов. В связи с этим приведены уровни кортизола, кортикостерона, Т<sub>4</sub> и ТТГ (табл. 11).

Таблица 11. Динамика уровня гормонов в сыворотке крови белых крыс под влиянием гипокинетического и комбинированного стресса

Показатели (нг/мл)	Исследуемая группа, длительность эксперимента							
	изолированный стресс				комбинированный стресс			
	1 сутки (конт- роль фон)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрони- ческий стресс)	1 сутки (3 недели алимент. стресса)	7 сутки (острый стресс)	14 день (подострый стресс)	21 день (хрони- ческий стресс)
<b>самцы ♂</b>								
Кортизол	32,5±7,4	5,7±2,9 *	10,0±2,8 *	10,9±2,5 *	38,7±7,5	25,5±4,2 ●	9,7±2,4 *	25,7±4,1 ●
Кортико- стерон	213,0± 6,6	441,6± 22,1*	496,0± 35,3*	613,4± 6,1*	239,4± 20,6	473,6± 10,2*	570±9,3 *	622,8± 7,1*
ТТГ	2,2±0,5	2,1±0,4	3,0±0,6	2,8±0,7	1,1±0,2 ●	1,9±0,6	0,5±0,1 ●	1,2±0,3
Т <sub>4</sub> сво- бодный	5,1±1,5	7,4±1,1	11,1±0,9	7,0±2,1	7,5±0,9	5,6±1,2	12,5±1,8 *	10,0±2,8
Т <sub>4</sub> общий	120,0± 7,6	110,12± 7,4	105,4± 8,2	100,4± 7,6	119,4± 5,9	109,9± 7,1	101,9± 5,3	99,3± 4,4
<b>самки ♀</b>								
Кортизол	33,1±3,4	5,8±3,0 *	19,3±3,8 *	18,0±2,4 *	24,8±1,2 ▲●	11,1±3,5 ▲*	13,5±2,7 *	23,3±1,4
Кортико- стерон	206,0± 7,15	438,6± 16,7*	472,4± 29,1*	530± 29,5*▲	208± 6,7	463,3± 8,1*	502± 25,8*▲	576,2± 10,6*▲
ТТГ	1,2±0,3	1,4±0,3	3,6±1,4	0,76±0,1 ▲	2,7±1,3	0,9±0,2	1,5±0,4	2,2±0,6
Т <sub>4</sub> сво- бодный	11,0±0,8 ▲	11,0±1,5	11,0±1,6	11,0±0,7	7,5±1,3	9,4±1,0	11,9±0,8 *	9,4±2,3
Т <sub>4</sub> общий	116,7± 9,8	105,1± 7,8	98,2± 5,7	90,1± 5,26	123,4± 9,1	115,9± 6,2	108,2± 6,1	103,1± 7,8

Примечания: достоверность при  $p \leq 0,05$ : \* – по отношению к 1 суткам; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ – к группе крыс противоположного пола.

У крыс контрольной группы содержание гормонов в сыворотке крови имеет такие особенности: 1) уровень кортизола и кортикостерона не зависит от пола; 2) уровень ТТГ подвержен выраженным колебаниям внутри групп и при

существенной разнице между самцами и самками половые отличия данного показателя недостоверны, что связано с высокими значениями ошибки средней; 3) уровень свободного тироксина у самцов ниже, чем у самок на 54,0%.

*При моделировании алиментарного стресса* у самцов к третьей неделе ограничения питания достоверно снижается ТТГ, а у самок – кортизол, при этом ТТГ, в отличие от самцов, имеет тенденцию к росту, но его значения находятся на пороге статистической значимости различий между показателями групп.

*При моделировании гипокинетического стресса* у самцов и самок резко к 7-м суткам снижается уровень кортизола и повышается уровень кортикостерона. Обращает на себя внимание большой разброс индивидуальных показателей для каждого животного, когда ошибка средней имеет высокие значения, однако это не влияет на математическую достоверность расчетов. В дальнейшем уровень кортизола также снижен на протяжении всего эксперимента, что не зависит от пола, а уровень кортикостерона неизменно растет, достоверно отличаясь от фоновых значений.

*На модели комбинированного стресса* у самцов отмечены относительно высокие показатели кортизола, значимо превышающие его уровень при изолированной гиподинамии. При этом важно отметить, что изолированный алиментарный стресс на кортизол у самцов не оказывает влияния, а в условиях дополнительного стрессового воздействия при помещении крыс в фиксаторы, уровень кортизола не снижается, а напротив, «держится» относительно высоко, отмечен лишь «провал» его значений на 14 сутки, с восстановлением к 21-му дню. Интересно, что этот период сопровождается переходом состояния животного (судя по индексу Гаркави-Квакиной) от реакции тренировки к тяжелой стресс-реакции. При стрессе значимо возрастает уровень кортикостерона. Уровень свободного  $T_4$  меняется у самцов асинхронно с кортизолом – на 14-й день он статистически значимо увеличивается, а в остальные этапы – не меняется, как и кортизол, что отражает взаимосвязь этих гормонов.

У самок иная динамика: уровень свободного  $T_4$  остается высоким в условиях стресса, а вот уровень кортизола стабильно снижен, как при

гиподинамическом, так при алиментарном, и при комбинированном стрессе. Неизменно возрастает уровень кортикостерона.

*Таким образом,* при гипокинетическом стрессе у самцов и самок наибольшая динамика отмечена при определении уровня гормонов надпочечных желез: снижается уровень кортизола в 1,7-5,7 раз, а кортикостерон растет в 2,6-2,9 раз. У самок выявлена тенденция к росту ТТГ, при этом у самцов уровень ТТГ снижается в 2,0-6,0 раз ( $p < 0,05$ ), уровень Т4 сохраняется в пределах контрольных цифр, Т3 не меняется.

#### **4.2. Структурные изменения щитовидной железы**

*Органный уровень – анатомия железы.* Щитовидная железа белой крысы располагается в передней области шеи, достигая снизу 5-го хрящевого кольца трахеи (рис. 10). Доли железы неправильной пирамидальной или овальной формы, расположены сбоку трахеи, оставляя переднее пространство свободным, перешеек практически не выражен. Железа имеет очень темный буро-красный цвет, блестящую гладкую ровную поверхность, мягко-эластичную консистенцию.

Объем железы у самок контрольной группы составляет в среднем  $39,6 \pm 3,8 \text{ мм}^3$ , а у самцов немного больше –  $42,5 \pm 4,2 \text{ мм}^3$ , не смотря на то, что самцы крупнее. Асимметрия долей (разница их объема) выражена умеренно и не имеет математической значимости.

Макроскопически у самцов не выявлено статистически значимых изменений морфометрических (органометрических) показателей железы в период моделирования стресса, а у самок, выведенных из эксперимента на третьей неделе комбинированного стресса, выявлено значимое увеличение объема железы до  $56,7 \pm 4,0 \text{ мм}^3$  при  $p \leq 0,05^*$ , при сравнении с показателем контрольной группы.

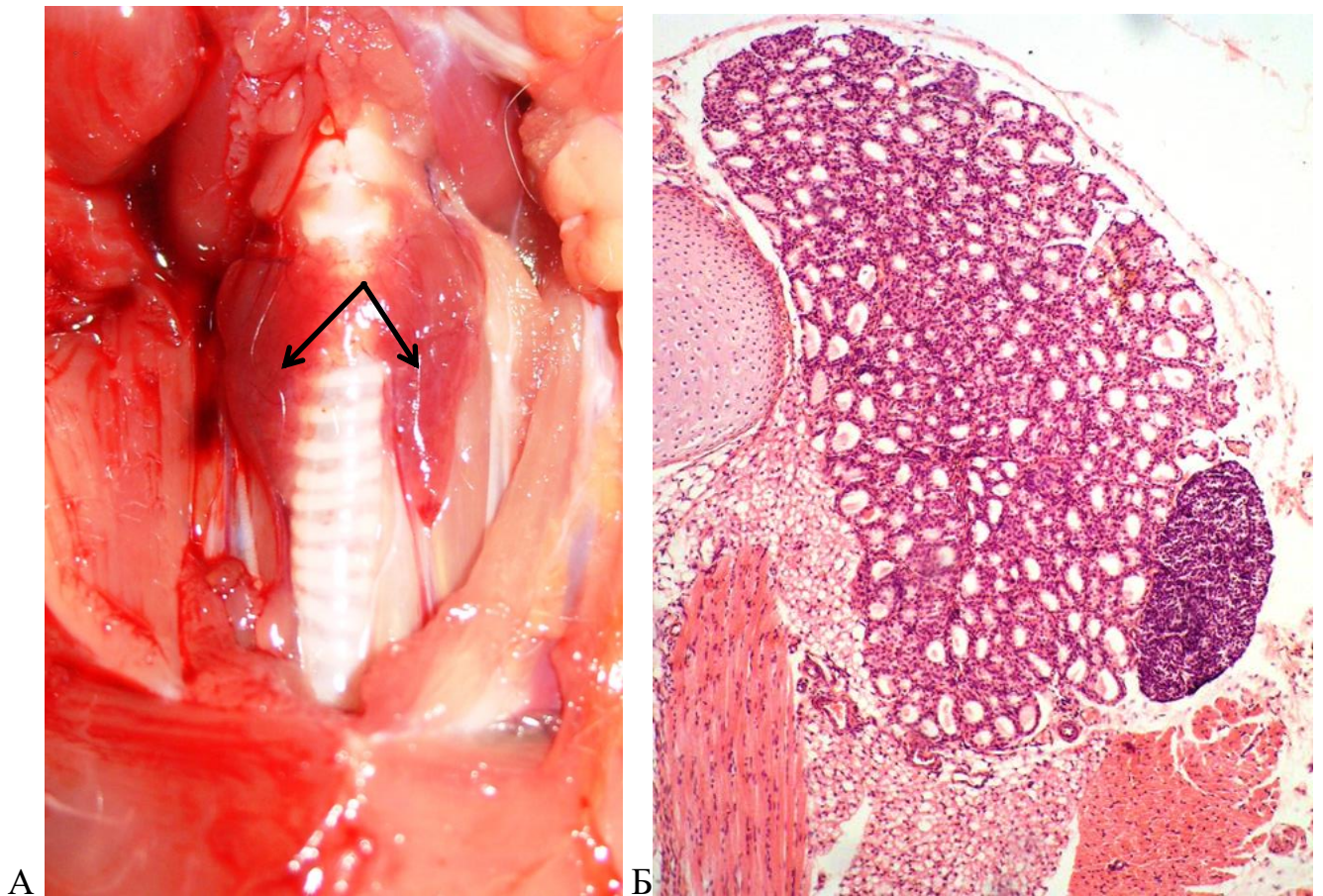


Рисунок 10. Щитовидная железа самки белой крысы, контрольная группа, возраст 130 суток. А. Анатомия железы. Стрелками обозначены доли в области верхних полюсов. Правая доля визуальнее крупнее за счет длины. Перешеек не выражен. Б. Гистотопография. Взаиморасположение мышц передней области шеи, хрящей гортани, паращитовидной железы и соединительной ткани, заполняющей пространство между органами и формирующей строму щитовидной железы.

*Тканевой уровень – гистология железы.* Строма: щитовидная железа покрыта тонкой капсулой, состоящей из нескольких слоев фиброцитов, разделённых пучками коллагеновых волокон. В толще капсулы расположены преимущественно мелкие сосуды (кровеносные и лимфатические), нервные волокна, продолжающиеся внутрь железы вместе с тонкими септами, отходящими от капсулы. Паренхима представлена тремя типами клеток (рис. 11): 1) тироциты, формирующие стенки фолликулов; 2) интерфолликулярные клетки,

расположенные между фолликулами в виде островков (это эпителиальные клетки, как и тироциты); 3) парафолликулярные светлые С-клетки (или К-клетки).

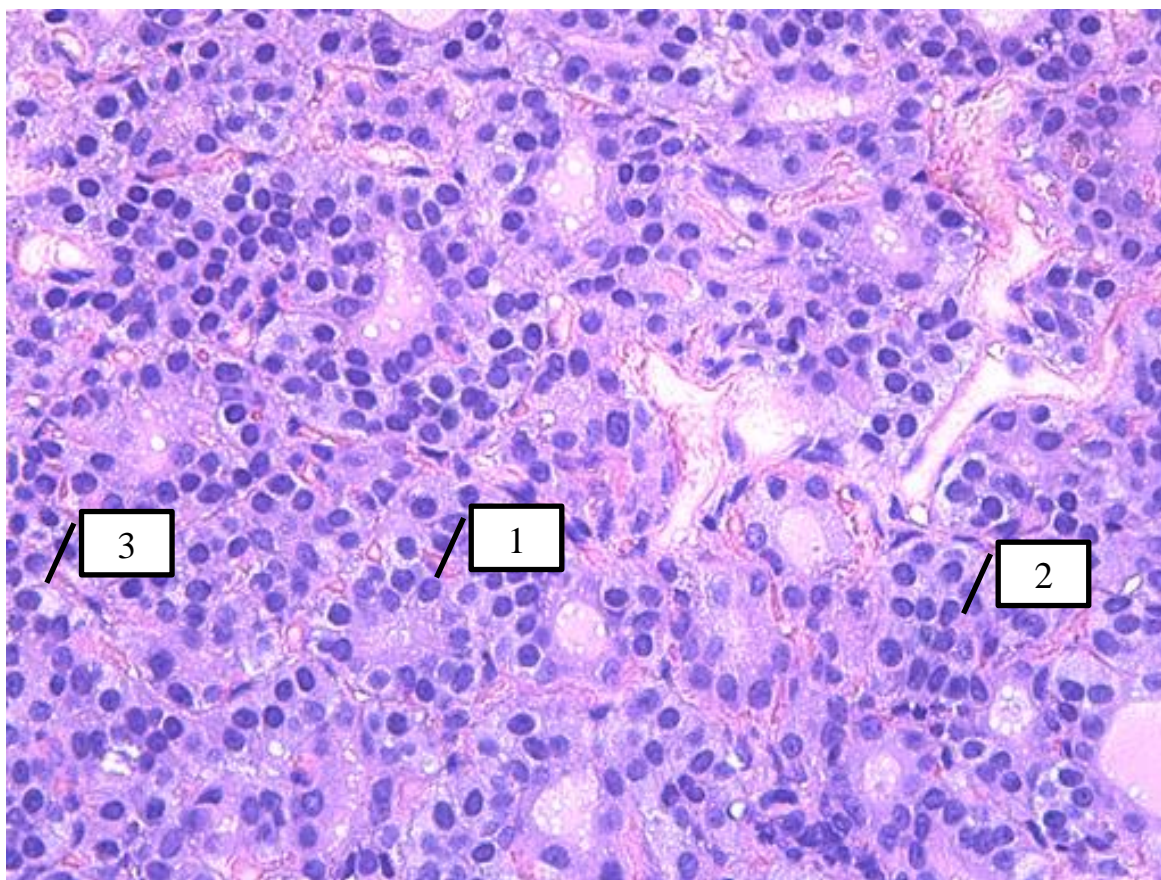


Рисунок 11. Фрагмент щитовидной железы самки белой крысы. Контрольная группа, возраст 90 суток. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение: 1 – тироциты в стенке фолликулов; 2 – интерфолликулярные клетки; 3 – парафолликулярные С-клетки.

Тироциты и интерфолликулярные эпителиоциты развиваются из глоточного кармана и имеют энтодермальное происхождение, а С-клетки имеют эктодермальное происхождение из нейроэндокринного пула.

В возрасте 3 месяцев щитовидная железа белой крысы *в норме (контрольная группа)* имеет относительно невысокую степень дифференцировки ткани (рис. 12). Это визуализируется за счет значительной доли интерфолликулярного эпителия, как резервной популяции тироцитов в паренхиме

железы и слабого развития фолликулярного аппарата (рис. 11, 12), что соответствует возрастной норме строения железы у крыс. К 4-му месяцу она дифференцируется в зрелый орган.

На наш взгляд, такая особенность морфологии щитовидной железы у трехмесячных крыс отражает ряд онтогенетических закономерностей. Поскольку, несмотря на то, что крысы в этом возрасте уже половозрелые, у них продолжается интенсивный рост с положительным азотистым балансом, возможно из-за взаимосвязи гонад и щитовидной железы, продолжающихся активных анаболических процессов – репродуктивная функция в этот период нестабильна.

Поскольку этот эксперимент длился 6 недель, у контрольных животных железа успела сформироваться в рамках морфологической нормы зрелого органа (рис. 13), при выполнении измерений использовали животных той же возрастной группы, что и группа сравнения. В возрасте 90-110 суток встречаются железы с неоднородным строением паренхимы (рис. 13 А-В), где чередуются участки низкой и высокой дифференцировки, фолликулы имеют вытянутую форму в незрелых зонах капилляры расположены густо и диффузно, а в зрелых – по периферии фолликулов. В 4 месяца и старше структура железы выглядит однородной, ткань содержит многочисленные округлые фолликулы, преимущественно среднего размера, часть из них попадает в срез «горбушкой» или минимальным диаметром, эти участки формируют ложные межфолликулярные островки, по сути, являясь частями фолликулов, коллоид которых не попал в срез.



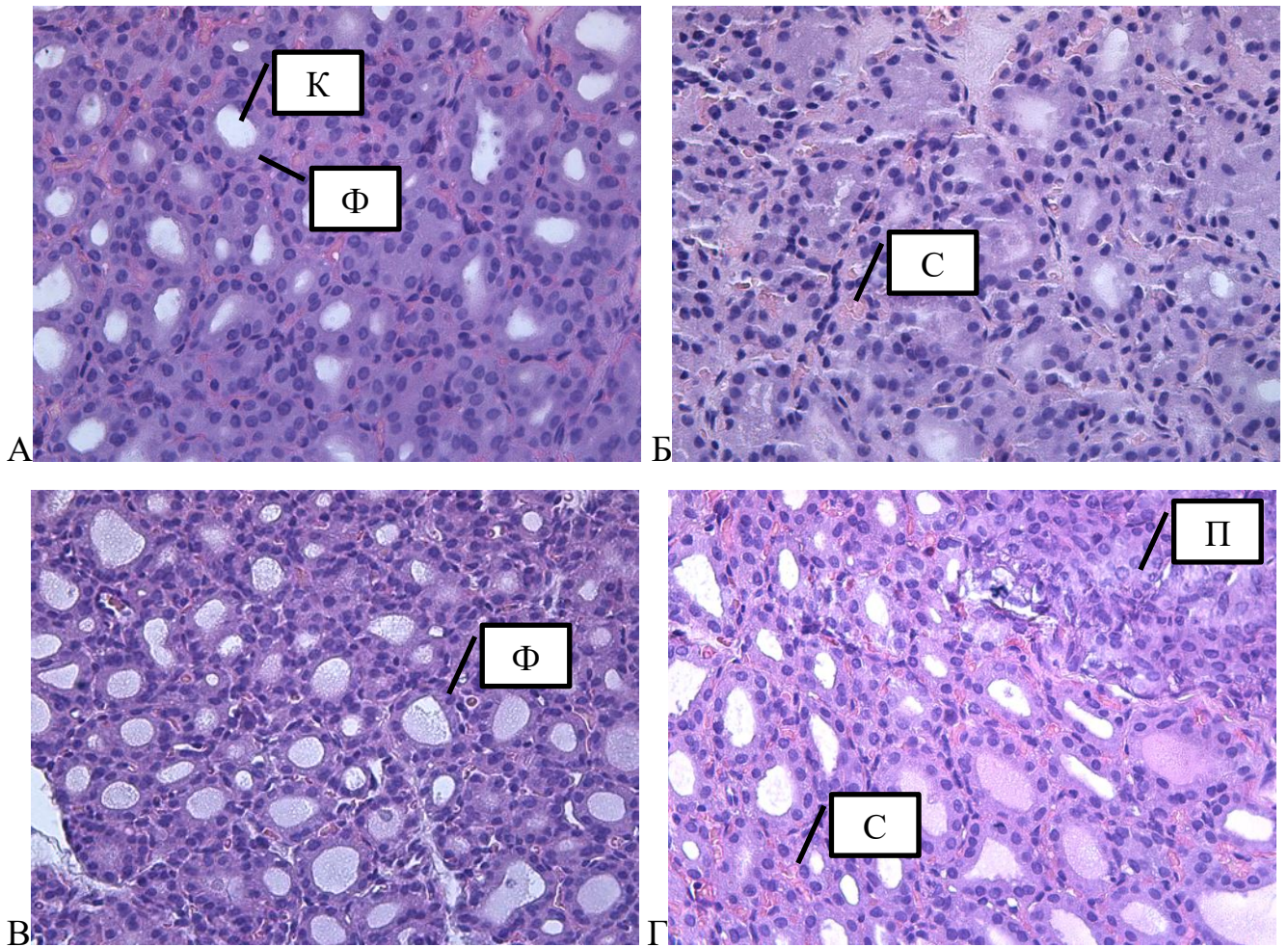


Рисунок 12. Фрагменты щитовидных желез самок белой крысы. Контрольная группа, возраст 90-110 суток. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение структурных элементов: К – коллоид, С – сосуды, Ф – фолликулы, П – паращитовидная железа.

А – возраст 90 суток, низкая степень дифференцировки ткани, типичное строение железы, преобладает интерфолликулярный эпителий, фолликулы немногочисленные с небольшим содержанием коллоида.

Б – возраст 90 суток, участок без фолликулов, с активно дифференцирующимися клетками, интенсивным кровоснабжением, обилием микрососудов с едва заметной стенкой, заполненных дисковидными изогнутыми эритроцитами, капилляры расположены в тяжах соединительнотканых септ.

В – возраст 110 суток, преобладают округлые фолликулы мелкого размера.

Г – возраст 110 суток, фолликулы со сформированной сосудистой сетью по периферии, справа сверху фрагмент паращитовидной железы.

Истинные интерфолликулярные тироциты немногочисленны. Сосудистая сеть развита неравномерно: по периферии фолликулов, как и вокруг островков, образуются густые сплетения микрососудов, ориентированные на базальные поверхности тироцитов, а в участках с незрелой паренхимой полнокровные многочисленные микрососуды расположены хаотично.

Тироциты в фолликулах преимущественно низкопризматические (кубические) с выраженной полярностью: апикальная поверхность их выпуклая, имеет видимые микроворсинки, цитоплазма базофильная, ядра округлые, расположены ближе к базальной части клетки, ядрышки не видны.

Интерфолликулярный эпителий зрелых желез имеет аналогичное строение и также ориентирован вокруг базальной мембраны, формируя псевдомикрофолликулы, также оплетенные сетью капилляров, как и истинные зрелые фолликулы, с узким перикапиллярным пространством в виде тонкой щели между базальной мембраной и капилляром.

С-клетки выглядят очень светлыми, за счет того, что их цитоплазма содержит много везикул, чаще они находятся в центре железы среди тироцитов интерфолликулярных островков, занимая внутри них периферическое положение – ближе к капилляру. Это также свидетельствует о гормональной активности таких структурных элементов.

Наглядно этапы дифференцировки щитовидной железы половозрелой белой крысы отражены на рисунке 13, где описанные выше изменения представлены в сравнении на микрофотографиях, сделанных у крыс с интервалом возрасте в 10-20 суток.

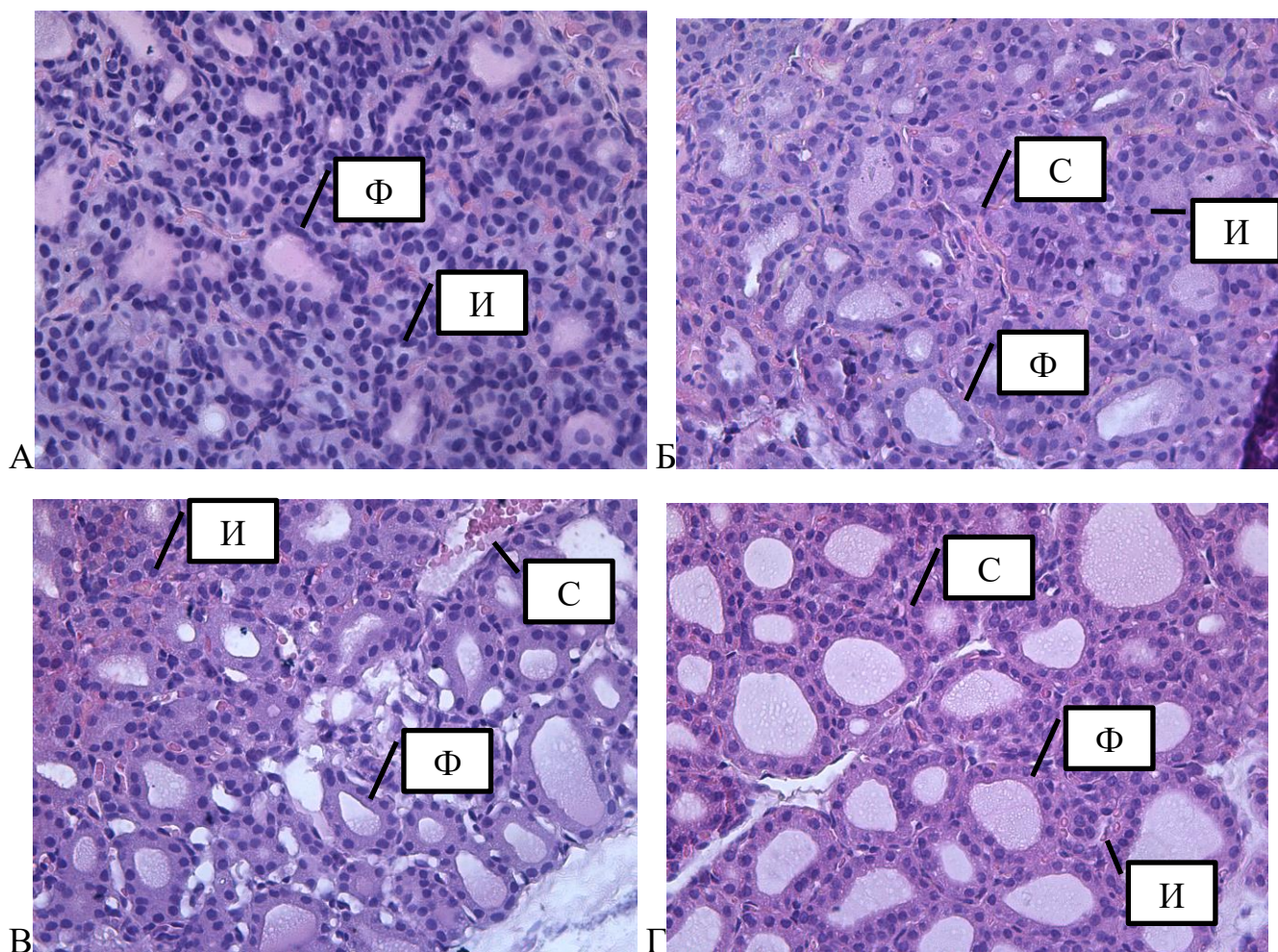


Рисунок 13. Фрагменты щитовидных желез белой крысы. Контрольная группа, возраст 90-130 суток. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение структурных элементов: С – сосуды, Ф – фолликулы, И – интерфолликулярные островки. Последовательные этапы дозревания железы в репродуктивном возрасте.

А – самка, возраст 90 суток, преобладает интерфолликулярная ткань.

Б – самец, возраст 110 суток, участок сформированной ткани железы, где среди фолликулов округлой формы, множество фолликулов неправильной формы: овальных, угловатых.

В – самка, возраст 110 суток, участок с низкой степенью дифференцировки ткани и рядом с более высокой степенью зрелости, асимметричные фолликулы.

Г – самец, возраст 130 суток, зрелая железа, дифференцированная ткань, округлые фолликулы.

При алиментарном стрессе у крыс преобладают железы со слабым развитием фолликулярного аппарата, когда органы 110-суточных подопытных животных, выглядят как железы 90-суточных крыс контрольной группы. Это характерно как для самцов, так и для самок, при этом у самцов задержка дифференцировки ткани железы на фоне ограничения питания более выражена (рис. 14).

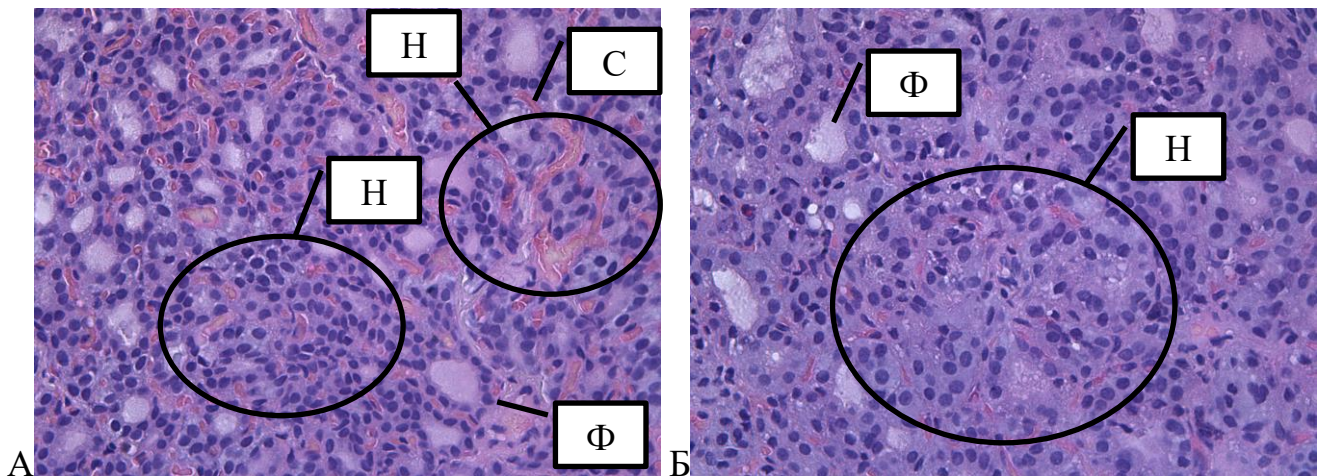


Рисунок 14. Фрагменты щитовидных желез белой крысы. Алиментарный стресс 21 сутки, возраст 110 суток. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение структурных элементов: С – сосуды, Ф – фолликулы, Н – область низкодифференцированной ткани, образована эпителиальными клетками, не формирующими фолликулы.

А – железа самки, на фоне ткани с низкой степенью дифференцировки, многочисленные фолликулы небольшого размера, различной формы, преобладают округлые и овальные фолликулы; по всей поверхности среза полнокровие сосудов.

Б – железа самца, на фоне ткани с низкой степенью дифференцировки, единичные фолликулы среднего размера; полнокровие сосудов менее выражено.

При изолированном гипокинетическом стрессе выявлена аналогичная тенденция (рис. 15), но визуально – с прогрессивным запустеванием сосудистого русла, не характерным для эндокринных желез.

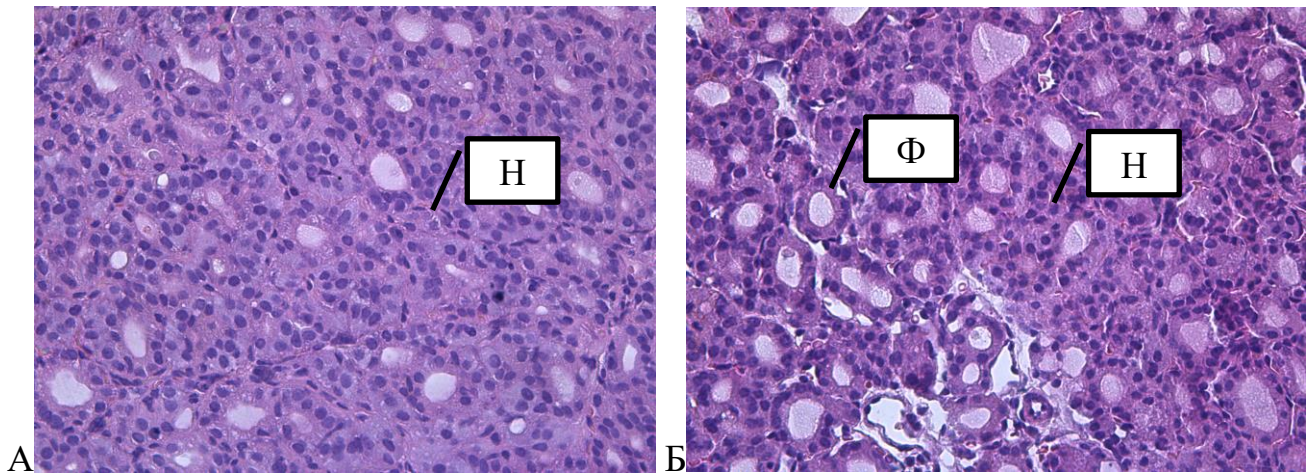


Рисунок 15. Фрагменты щитовидных желез белой крысы. Гипокинетический стресс. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение структурных элементов: С – сосуды, Ф – фолликулы, Н – низкодифференцированная ткань, образована интерфолликулярными клетками.

А – железа самки, 7 суток эксперимента, возраст 100 суток, на фоне ткани с низкой степенью дифференцировки, многочисленные фолликулы небольшого размера, различной формы, преобладают округлые и овальные.

Б – железа самца, 14 суток эксперимента, возраст 105 суток, многочисленные фолликулы мелкого и среднего размера.

*При комбинированном стрессе* сформированные ранее немногочисленные фолликулы постепенно приобретают причудливую форму, гипертрофируются, содержат много коллоида, при этом ткань содержит крупные островки интерфолликулярного эпителия, являющегося резервным пулом восстановления паренхимы (рис. 16).

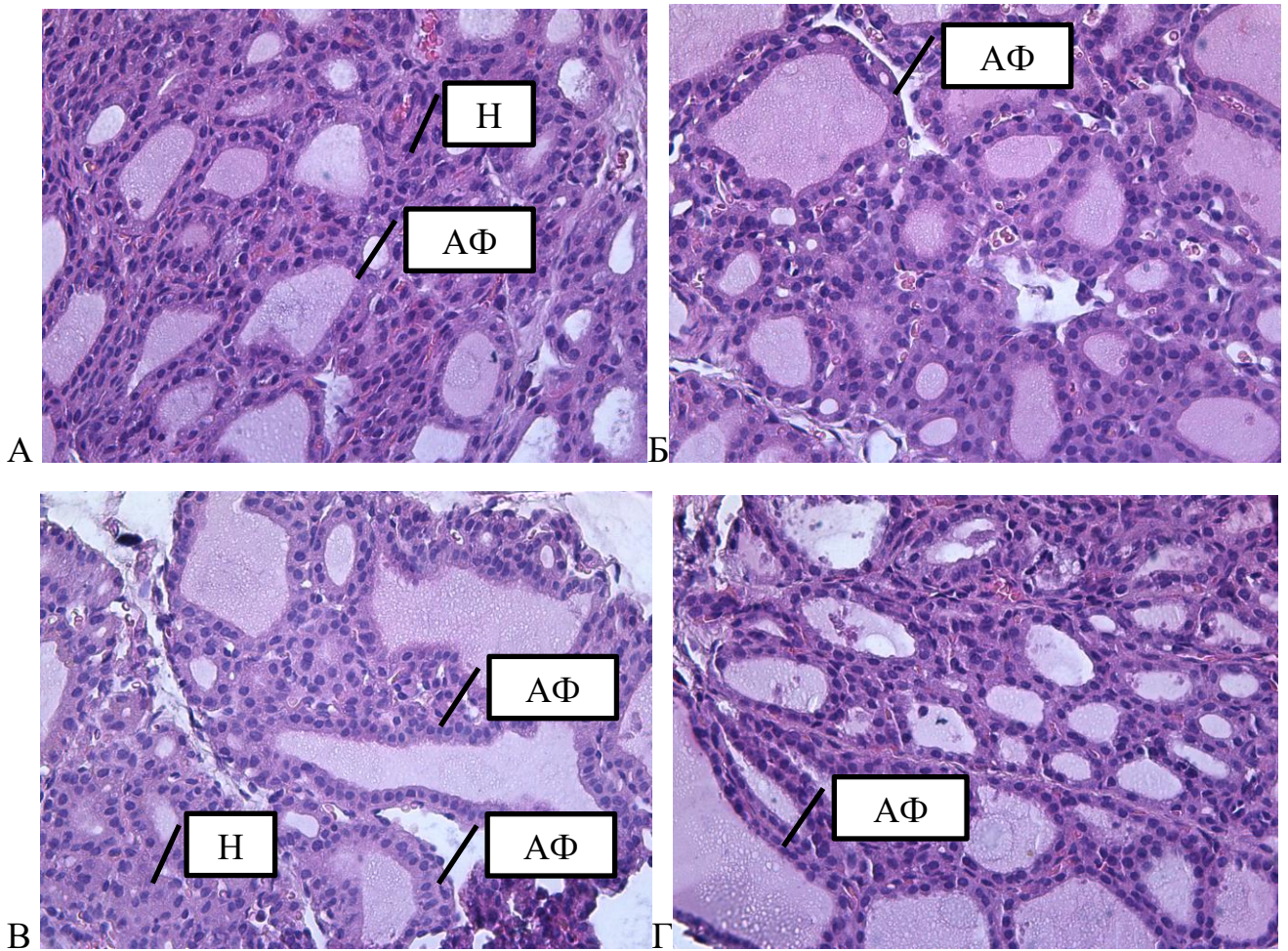


Рисунок 16. Фрагменты щитовидных желез белой крысы. Комбинированный стресс, возраст 110-130 суток. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200х. Обозначение структурных элементов: Н – недифференцированная ткань с интерфолликулярными клетками, АФ – крупные фолликулы с выраженной асимметрией или неправильной формой.

А – самка, возраст 110 суток, стресс 14 сутки, зрелая железа, участки недифференцированной ткани, фолликулы неправильной формы.

Б – самец, возраст 110 суток, стресс 14 сутки, зрелая железа, группы крупных и средних фолликулов, полиморфных и асимметричных.

В – самка, возраст 130 суток, стресс 21 сутки, участки с низкой степенью дифференцировки ткани и рядом с более высокой, преобладают асимметричные фолликулы, причудливой формы с высоким призматическим эпителием.

Г – самец, возраст 130 суток, стресс 21 сутки, множество крупных и средних фолликулов неправильной формы, сформированные уплощенными тироцитами.

Тироциты сохраняют призматическую форму (рис. 16 А, Б), а в крупных и деформированных фолликулах меняют высоту: в ряде фолликулов становятся высокопризматическими (цилиндрическими) (рис. 16 В), в некоторых – уплощаются, что хорошо заметно по сужению слоя цитоплазмы в апикальной части клетки – между ядром и плазмолеммой, отделяющей клетку и коллоид (рис. 16 Г).

*При морфометрических исследованиях* выявлен ряд закономерностей, отражающих эти направления изменений уровня гормонов и структуры железы (табл. 12).

Обращает на себя внимание большая зрелость щитовидной железы самцов *контрольной группы* в возрасте 110 суток, чем у самок, что определено меньшей относительной площади эпителия и большей относительной площади коллоида на срезах ткани. Это закономерно проявляется в динамике фолликулярно-коллоидного индекса, являющегося показателем зрелости и функциональной активности железы. Расчетные индексы отражают обратные значения, то есть при их снижении, признак проявлен больше, а рост индекса свидетельствует о менее выраженном проявлении признака. Важно отметить, что при низком фолликулярно-коллоидном индексе, свидетельствующем о достоверно большей зрелости железы у самцов по сравнению с самками, выявлен высокий индекс Брауна, свидетельствующий о более низкой активности щитовидной железы самцов по сравнению с самками в этом возрасте. Это закономерно отражено большим уровнем тироксина, вырабатываемого железой самок.

При *алиментарном стрессе* к завершению трехнедельного ограничения питания у самок нет изменений показателей дифференцировки железы по сравнению с контрольной группой, а у самцов ткань значительно отличается от контрольных показателей, не происходит ее развитие с момента начала ограничения питания, преобладающими в органе являются эпителиальные клетки и строма, коллоида мало, сохраняется высокая активность тироцитов.

Таблица 12. Гистологические показатели щитовидной железы крыс в норме и на модели изолированного и комбинированного стресса разной длительности

Срок (сут)	Пол	Относительное содержание структурных компонентов железы, %			Фолликулярно-коллоидный индекс	Индекс склерозирования	Индекс Брауна	Эксцентриситет
		эпителия	коллоида	стромы				
<b>КОНТРОЛЬ (для алиментарного и гиподинамического стресса)</b>								
К	♀	63,8±2,2	22,5±2,6	13,7±1,3	2,9±0,4	4,7±0,3	8,1±0,4	0,14±0,02
	♂	50,3±3,3▲	34,5±1,8▲	15,2±1,9	1,5±0,2▲	3,3±0,7	9,6±0,3▲	0,36±0,03
<b>АЛИМЕНТАРНЫЙ СТРЕСС (он же группа контроля – 1 сутки для комбинированного)</b>								
21	♀	62,6±2,7	23,1±1,7	14,3±1,5	2,7±0,2	4,4±0,5	7,9±0,5	0,27±0,03
	♂	65,9±1,6*	16,8±1,9*▲	17,3±2,1	3,9±0,6▲	3,8±0,4	7,0±0,7*	0,38±0,07
<b>ГИПОДИНАМИЧЕСКИЙ СТРЕСС</b>								
7	♀	67,0±3,6	21,8±2,7	11,2±1,2	3,1±0,5	5,8±0,5	8,4±0,8	0,50±0,09
	♂	63,3±3,1*	24,7±2,6*	12,0±0,6	2,6±0,3*	5,3±0,4	8,5±0,7	0,49±0,09
14	♀	66,6±3,1	24,9±2,4	9,1±1,2	2,7±0,3	7,3±0,7	8,4±0,8	0,53±0,15
	♂	60,3±3,4	29,8±2,8	10,0±0,6	2,0±0,3	6,0±0,6	8,6±0,6	0,56±0,12
21	♀	61,1±2,0	24,7±1,3	15,2±1,0	2,5±0,2	4,0±0,4	8,2±0,5	0,67±0,12
	♂	60,0±1,8	26,3±0,7	14,7±0,9	2,3±0,2	4,0±0,3	7,3±0,3	0,84±0,14*
<b>КОМБИНИРОВАННЫЙ СТРЕСС</b>								
7	♀	66,7±3,5	24,0±2,2	9,2±1,2*●	2,8±0,3	7,3±0,6*●	8,5±0,9	0,44±0,07
	♂	62,3±3,6	28,8±2,6*	8,2±0,6*●	2,2±0,3*	7,7±0,5*●	8,7±0,6	0,60±0,09
14	♀	48,5±2,9●	35,8±3,0	15,7±1,8●	1,4±0,1●	3,0±0,4●	10,4±0,9	0,59±0,09
	♂	59,2±3,0*▲	24,6±2,1*▲	15,3±1,8●	2,3±0,2*▲	3,8±1,2●	8,4±0,6	0,83±0,14*
21	♀	52,5±4,2*	33,3±2,9●	14,2±1,0**	1,6±0,2	3,7±0,2**	8,7±0,5	0,66±0,07*
	♂	56,7±2,1*	29,8±2,8	13,4±2,2	1,9±0,2	4,2±0,6	8,8±0,4*	0,92±0,11*

*Примечания:* Достоверность при  $p \leq 0,05$ : \* - достоверно по отношению к контролю; ● – к группе с изолированным стрессом; ▲ - к группе крыс противоположного пола.

*При гиподинамическом стрессе* изменения происходят поэтапно, затрагивают преимущественно самцов. По-видимому, в острой фазе происходит



активная резорбция коллоида, что создает значимые отличия между тканью контрольных особей и крыс, подвергшихся стрессу. Далее эти изменения стабильно сохраняются и практически не прогрессируют, в отличие от модели комбинированного стресса.

При остром *комбинированном стрессовом* воздействии на 7 сутки у крыс уменьшается относительная площадь стромы, что происходит за счет запустевания сосудов и отражается на динамике индекса склерозирования. У самцов также резорбируется коллоид. В период между 7 и 14 сутками происходит быстрая дифференцировка ткани железы. Нарастают размеры фолликулов, площадь коллоида не на всех этапах успевает восстановиться из-за активной его резорбции, увеличивается площадь сосудистого русла. В этот период железа вырабатывает высокие уровни  $T_4$ , соответственно достоверно меняются индексы зрелости и склерозирования. На 14-е сутки такая железа поддерживает адаптационные процессы в организме животного, когда происходит истощение надпочечных желез.

Важно отметить, что в условиях стресса (когда индекс Гаркави-Квакиной приближается к значению реакции тренировки и тяжелой стресс-реакции), дифференцировка щитовидной железы происходит асинхронно. К 21-м суткам стрессового воздействия участки незрелой ткани чередуются с зонами расположения очень крупных фолликулов причудливой формы с очень высоким эксцентриситетом (с существенным отклонением их формы от окружности, угловатых и асимметричных). При этом у самок преобладают высокие клетки, свидетельствующие о повышении функции железы, а в фолликулах самцов чаще встречаются уплощенные тироциты (рис. 16 В, Г).

Таким образом, в работе выявлен ряд закономерностей строения щитовидной железы крыс контрольной группы и влияния стресса на ее структуру и функцию.

Щитовидная железа белых крыс контрольной группы в возрасте 130 суток не имеет значимых отличий по объему у самок и самцов (несмотря на то, что самцы крупнее). В период 3-4 месяцев у белых крыс в норме происходит

дозревание ткани железы, сопровождающееся формированием фолликулов из камбиальных элементов эпителия.

Стресс изменяет параметры щитовидной железы белых крыс на органном уровне только у самок, выведенных из эксперимента на третьей неделе модельного комбинированного стресса, когда выявлено значимое увеличение объема железы от  $39,6 \pm 3,8 \text{ мм}^3$  до  $56,7 \pm 4,0 \text{ мм}^3$  ( $p \leq 0,05$ ).

Действие стресса на тканевом уровне более проявлено у всех групп экспериментальных животных, начиная с 7-14 суток действия стрессовых факторов, достигая максимума к 21-м суткам.

При алиментарном стрессе органы 110-суточных подопытных животных, выглядят как железы 90-суточных крыс контрольной группы. Это характерно как для самцов, так и для самок, при этом у самцов задержка дифференцировки ткани железы на фоне ограничения питания более выражена. Это сопровождается количественными изменениями гистометрических параметров.

Если монофакторное воздействие вызывает преимущественно задержку дифференцировки ткани железы, то комбинированный стресс существенно меняет ее структуру: вызывает неравномерную дифференцировку ткани, формируются существенные отличия между контрольной группой и опытной, образуются фолликулы причудливой формы, тироциты меняют показатели соотношения вертикального и поперечного размеров.

## 4.2. Иммунофенотипические изменения щитовидной железы

Иммуноморфология щитовидной железы с маркерами пролиферации и апоптоза выявила ряд интересных закономерностей изменения клеточной кинетики тироцитов фолликулов и интерфолликулярных островков в условиях стресса.

*Исследование экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в тироцитах.*

У крыс контрольной группы активный рост и развитие щитовидной железы отражены маркером пролиферации Ki-67. У крыс контрольной группы, находящихся на нормальном питании, уровень экспрессии Ki-67 в среднем составил 2,40% у самок и 4,25% у самцов (рис. 17), такую разницу можно объяснить более интенсивным ростом самцов в данном периоде по сравнению с самками.

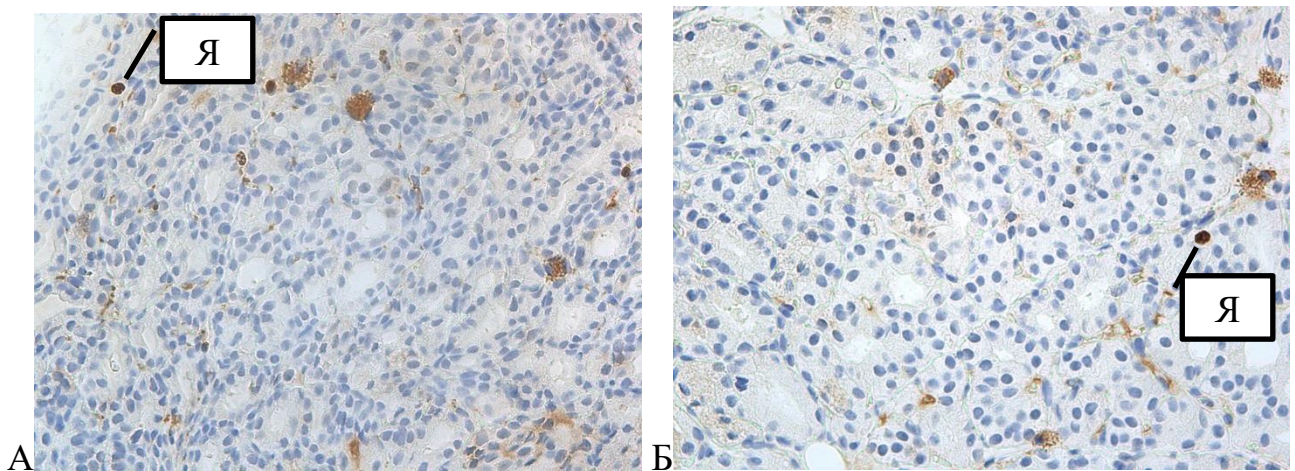


Рисунок 17. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Контрольная группа, возраст 90 суток. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к Ki-67. А. Самец. Б. Самка. Ядра тироцитов, вступивших в митотическое деление, окрашены коричневым пигментом (хромогеном). Обозначение: Я – ядро.

У самок крыс с моделью алиментарного стресса, содержащихся в течение 3 недель на специальной диете из прокаленного зерна и бромной воды, уровень Ki-67 вырос до 3,40%, однако все же его значение можно оценить как невысокое. У

самцов, наоборот, уровень пролиферации клеток снизился до 2,75% (рис. 18). Эта динамика математически незначима.

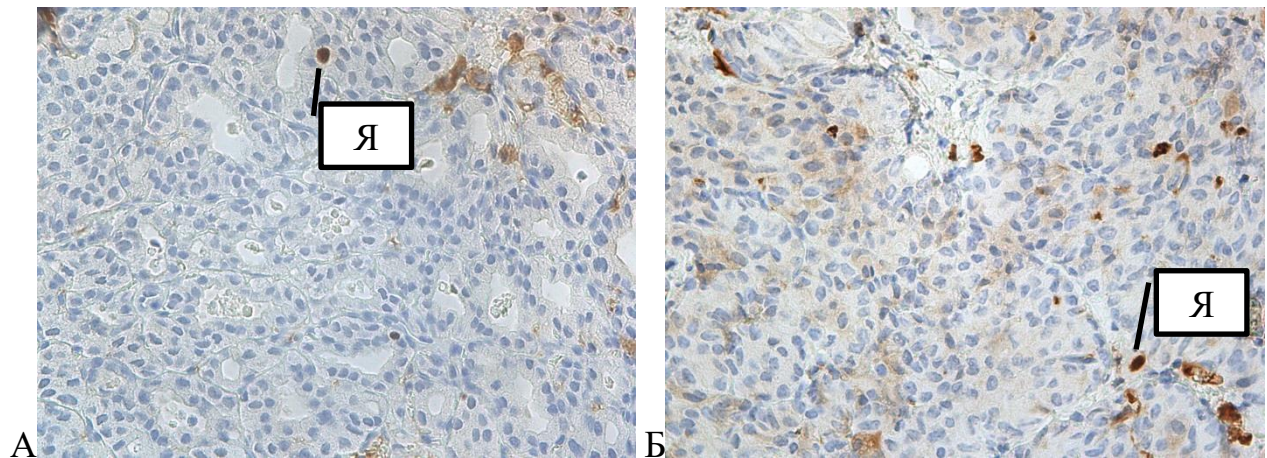


Рисунок 18. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Алиментарный стресс, 21 сутки, возраст 110 суток. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к Ki-67. А. Самец. Б. Самка. Ядра тироцитов, вступивших в митотическое деление, окрашены коричневым пигментом (хромогеном). Обозначение: Я – ядро. Экспрессия не имеет существенной разницы при сравнении с контрольной группой и между самцами и самками.

Животные, подвергавшиеся *иммобилизационному стрессу* в течение 7 суток, имеют значительные ( $p \leq 0,05$ ) изменения в экспрессии Ki-67 с выраженным половым диморфизмом (рис. 19). У самок экспрессия Ki-67 достигла в среднем 11,25%, что в 5 раз выше контроля. У самцов, наоборот, это значение упало до 1,50%. Экспрессия у самок на 7 сутки значительно более выражена, чем у самцов и крыс с алиментарным стрессом. На 14 сутки картина выравнивается за счет усиления экспрессии индекса пролиферации у самцов и снижения – у самок (рис. 19) до цифр 4,50-4,71% соответственно. Далее интенсивность экспрессии прогрессивно падает до 1,30-1,50%.

В группе животных *с комбинацией стресса*, содержащихся на дефицитной диете и иммобилизации, тенденция очень схожая, снижение экспрессии усугубляется на каждом этапе пролонгации стресса, при этом несколько самок не

дожили до конца эксперимента, а у самцов показатель Ki-67 упал еще ниже: до 1,30% (рис. 20).

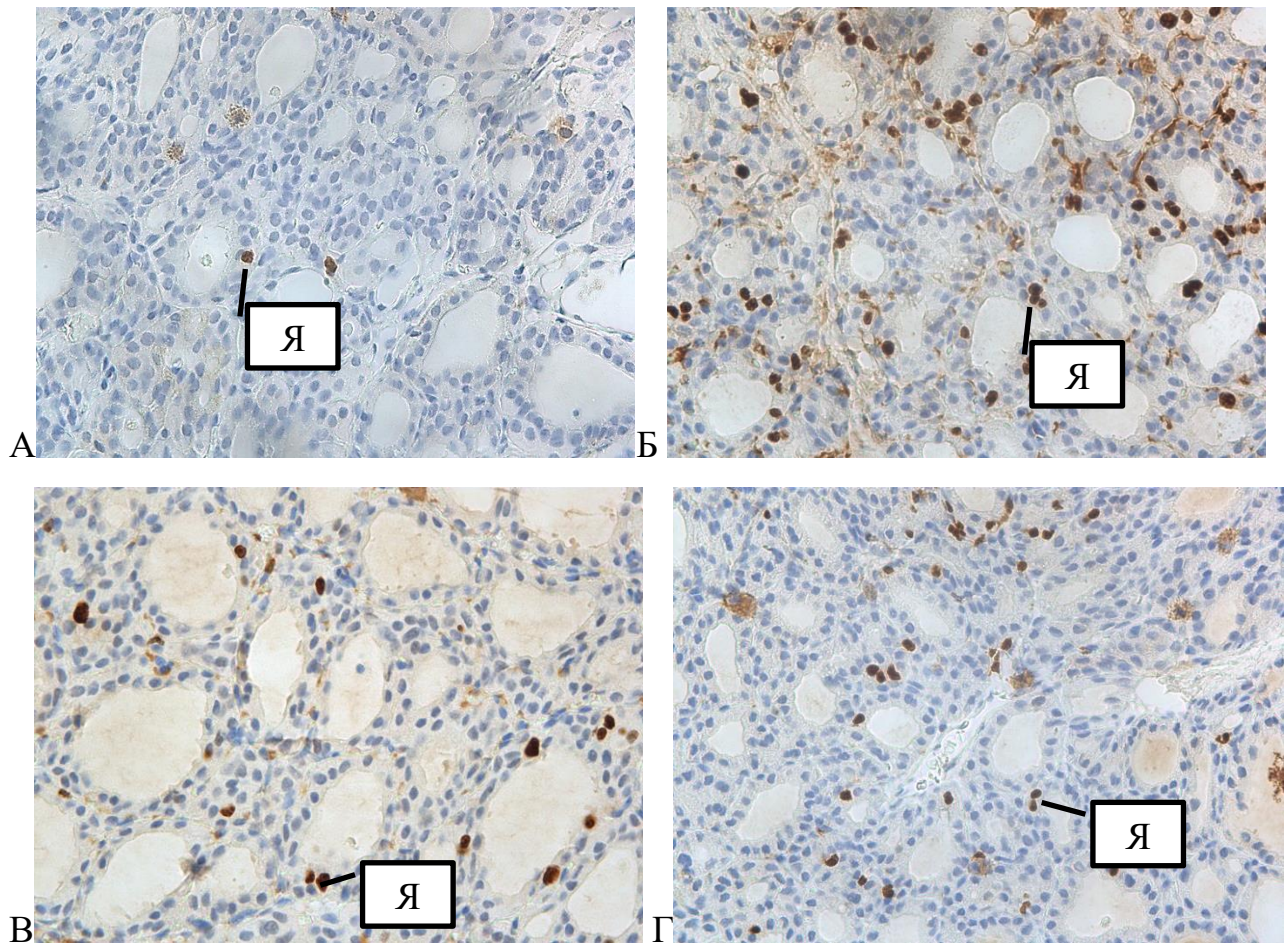


Рисунок 19. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Гиподинамический стресс, 7-14 сутки, возраст 100-110 суток. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к Ki-67. Ядра тироцитов, вступивших в митотическое деление, окрашены коричневым пигментом (хромогеном). Обозначение: Я – ядро.

А. Самец, 7 сутки стресса. Низкая экспрессия Ki-67.

Б. Самка, 7 сутки стресса. Высокая экспрессия Ki-67.

В. Самец, 14 сутки стресса. Средний уровень экспрессии Ki-67.

Г. Самка, 14 сутки стресса. Аналогично средний уровень экспрессии Ki-67.

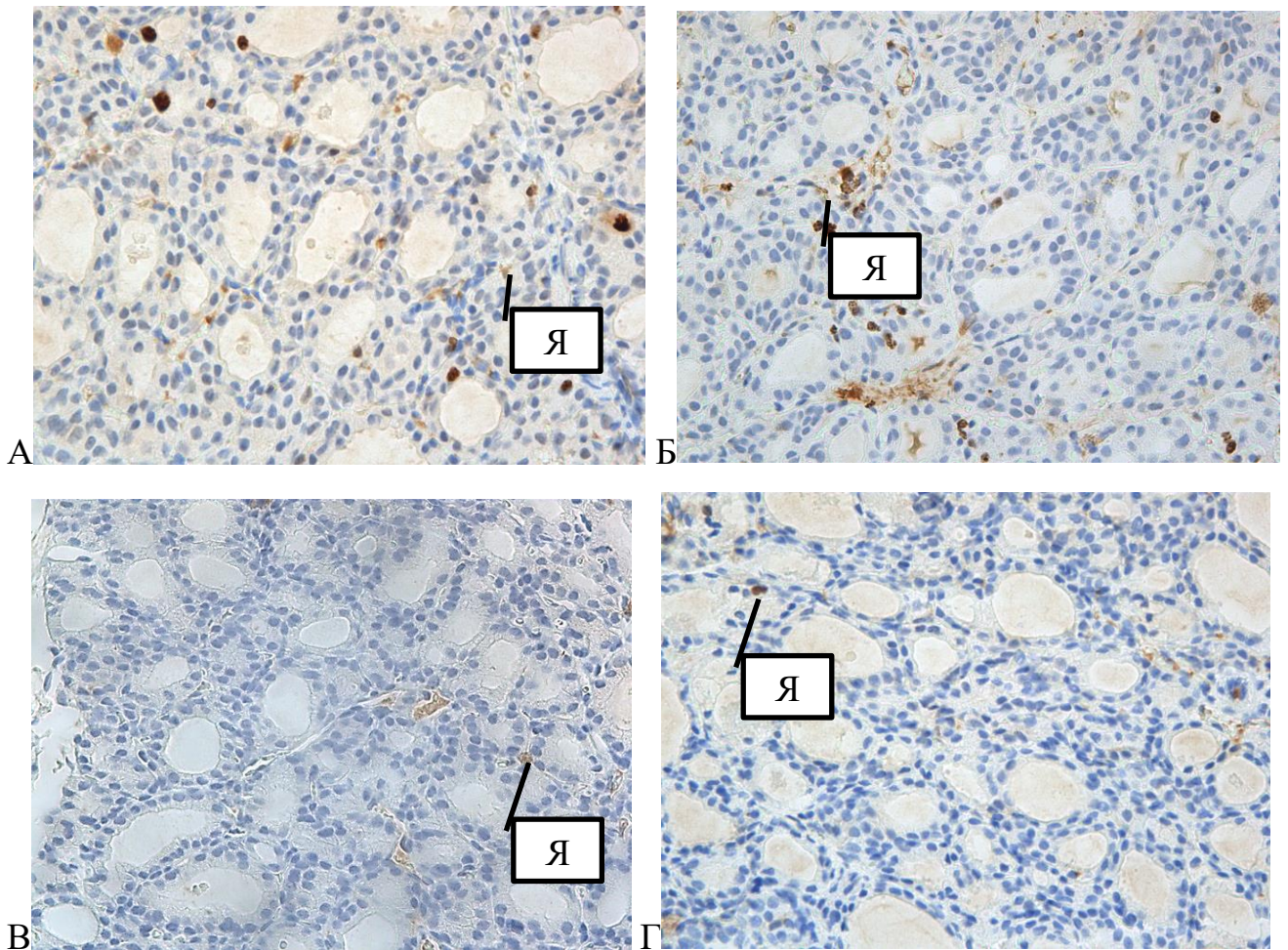


Рисунок 20. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Комбинированный стресс, 14-21 сутки, возраст 120-130 суток. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к Ki-67. Ядра тироцитов, вступивших в митотическое деление, окрашены коричневым пигментом (хромогеном). Обозначение: Я – ядро. Экспрессия на 14 сутки средняя, на 21 сутки крайне низкая, окрашены единичные ядра.

А. Самец, 14 сутки стресса. Средний уровень экспрессии Ki-67.

Б. Самка, 14 сутки стресса. Средний уровень экспрессии Ki-67.

В. Самец, 21 сутки стресса. Низкая экспрессия Ki-67.

Г. Самка, 21 сутки стресса. Низкая экспрессия Ki-67.

Множественные сравнения между группами животных показали достоверные отличия группы самок, подвергшихся стрессу и находящихся на нормальном питании, от всех групп, кроме аналогичной группы самцов (по

методу Краскела-Уоллиса при значении  $p \leq 0,05$ ). Многофакторный анализ ANOVA показал высокую степень влияния (96,7%) пола животных на показатели пролиферации железистого эпителия, а также стрессового воздействия (54,28%).

*Определение экспрессии маркеров апоптоза FAS-R на тироцитах.*

Подсчет уровня экспрессии позволил выявить определенные закономерности. Вообще уровень экспрессии FAS-R в эпителии щитовидной железы очень высокий. У крыс *контрольной группы* достаточно интенсивное окрашивание тироцитов, подавляющее большинство клеток несут FAS-рецепторы в растворимом виде с локализацией реакции в цитоплазме и на ядрах, лишь изредка контурируя и мембраны (рис. 21).

В группах животных, подвергавшихся *алиментарному стрессу*, содержащихся на специальной диете, экспрессия FAS-рецепторов уже на ранних этапах, на 7-14 сутки у самок снизилась на 40% относительно контрольной группы (преимущественно цитоплазматическое слабое окрашивание 60% клеток, до 10% ядер имели положительную окраску), а у самцов показатели практически не изменились и составили около 90% слабо окрашенных клеток (рис. 21).

После 7-ми суточного *иммобилизационного стресса* 100% клеток железистого эпителия имеют среднеинтенсивную окраску цитоплазмы и ядер (рис. 22), как у самок, так и у самцов. Далее уровень экспрессии остается высоким.

При *комбинированном многофакторном стрессе* изменения экспрессии FAS –рецептора не изменяются, не происходит истощения, клетки продолжают высоко интенсивно экспрессировать этот рецептор, продолжая существовать. По-видимому, используемый нами клон фирмы ABCAM, хорошо реагирует с растворимой формой белка в цитоплазме. Клетки, экспрессирующие его на мембране, запускают гибель и апоптоз по внешнему пути, а имеющие его повышенный уровень в цитоплазме, демонстрируют готовность к гибели, но не инициируют ее (рис. 23).

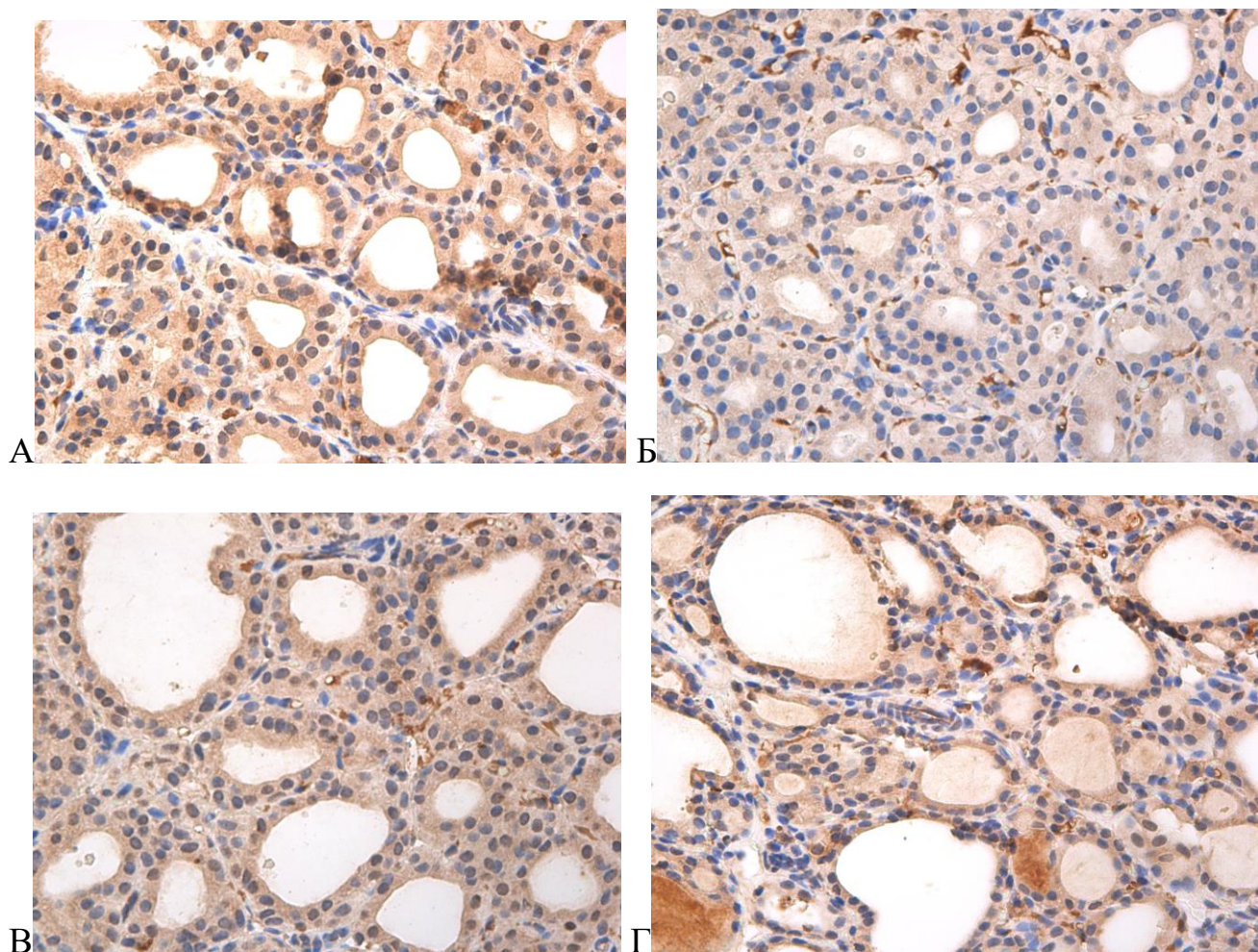


Рисунок 21. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Контрольная группа, возраст 110 суток (А, В) и Алиментарный стресс, возраст 110 суток (Б, Г). Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к FAS-R. Тироциты, имеющие факторы апоптоза в цитоплазме или ядре, окрашены коричневым пигментом (хромогеном).

А. Самка, контроль. Средний уровень экспрессии FAS-R.

Б. Самка, 14 сутки алиментарный стресс. Низкий уровень экспрессии FAS-R

В. Самец, контроль. Средний уровень экспрессии FAS-R.

Г. Самец, 14 сутки алиментарный стресс. Средний уровень экспрессии FAS.



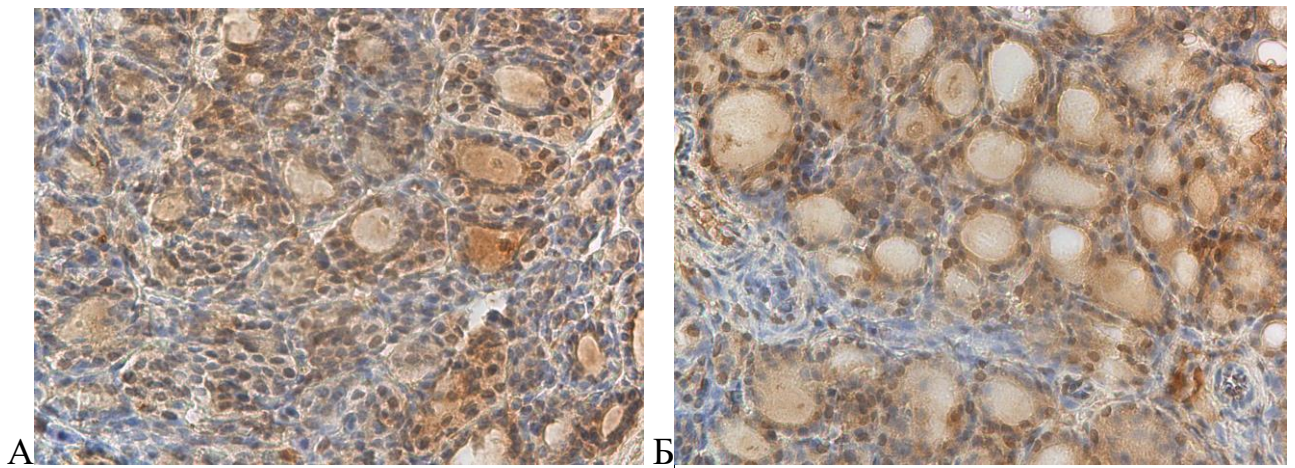


Рисунок 22. Фрагменты щитовидной железы белой крысы. Имобилизационный стресс, возраст 100 суток Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к FAS-R. Тироциты, имеющие факторы апоптоза в цитоплазме или ядре, окрашены коричневым пигментом (хромогеном).

А. Самка, 7 сутки гиподинамический стресс Высокий уровень экспрессии FAS-R.

Б. Самец, 7 сутки гиподинамический стресс Высокий уровень экспрессии FAS-R.

Сравнение результатов исследования пролиферативной активности (маркер Ki-67) и маркеров апоптотической активности FAS-R-рецепторов тироцитов у лабораторных животных, подвергшихся 7-дневному комбинированному стрессу позволяет сделать выводы о различной реакции фолликулярного эпителия на условия эксперимента у самцов и самок. По-видимому, такие отличия обусловлены разными онтогенетическими задачами, поставленными перед особью. Причем если Ki-67 отражает степень адаптации ткани щитовидной железы путем активного деления у самок, подвергшихся экспериментальному воздействию, то FAS-R отражает степень напряженности обменных процессов в тироцитах и готовность к апоптозу, возникающих в условиях эксперимента. Вероятно, что пролонгация сроков воздействия стресс-факторов позволит еще более истощить и напрячь компенсаторные механизмы в щитовидной железе, вплоть до развития сбоев в генетическом аппарате тироцита и появления аутоиммунной и пролиферативной патологии.

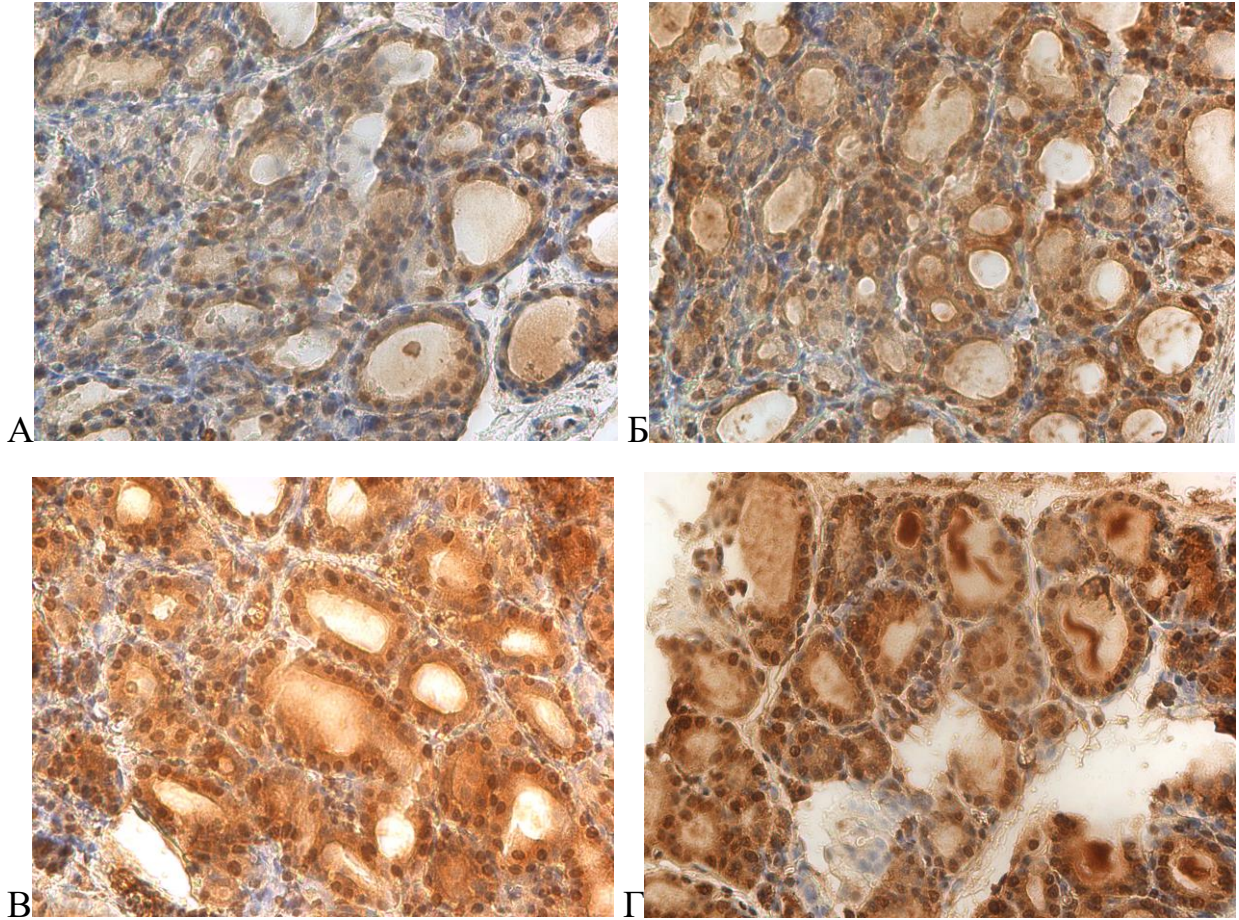


Рисунок 23. Фрагменты щитовидной железы белой крысы, возраст 110-130 суток. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к FAS-R. Алиментарный стресс, 21 сутки: А. Самец. Б. Самка. Комбинированный с иммобилизацией стресс: В. Самец. Г. Самка. Тироциты, имеющие факторы апоптоза в цитоплазме или ядре, окрашены коричневым пигментом (хромогеном). А. Самец, 21 сутки алиментарный стресс. Средний уровень экспрессии FAS-R. Б. Самка, 21 сутки алиментарный стресс. Средний й уровень экспрессии FAS-R В. Самец, 21 сутки комбинированный стресс. Высокий уровень экспрессии FAS-R Г. Самка, 21 сутки комбинированный стресс. Высокий уровень экспрессии FAS-R

Таким образом, прослеживается прямая связь между внешними стрессорами и развитием функциональных и органических компенсаторных изменений в щитовидной железе, что указывает на ведущую патогенетическую роль адаптационного синдрома в развитии патологии органа.

Высокая чувствительность щитовидной железы ко многим агрессивным факторам окружающей среды проявляется функциональными и морфологическими изменениями в ее тканях и обуславливает рост тиреоидной патологии в популяции.

Отмечается выраженный половой диморфизм исследуемых параметров, однако сохраняется общенаправленная тенденция – при действии стрессовых факторов, приближающих адаптационные системы организма к реакции тренировки и стресс-реакции экспрессия рецепторов программируемой клеточной гибели закономерно прогрессивно растет и не коррелирует с уровнем индекса пролиферации в тироцитах самцов и самок белых крыс.

Изменение показателей Ki-индекса пролиферации и FAS-R у экспериментальных животных достоверно указывает на роль многофакторного стресса в развитии нарушения клеточной кинетики щитовидной железы.

Эти закономерности побудили нас исследовать иммунофенотипический профиль ткани щитовидной железы человека при различных группах заболеваний, при этом, мы исследовали также маркеры bcl-2 (антиапоптотический фактор) и p53 (маркер онкогенеза).

## ГЛАВА 5. ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЕЕ ПАТОЛОГИИ

В данном разделе работы мы сравнивали экспрессию уже четырех маркеров: *Ki-67*, *FAS-R* (как и в эксперименте с животными) и добавили антиапоптотический *bcl-2* и маркер «страж генома» *p53*. Все эти белки регулируют клеточный цикл. *FAS-R* и *p53* регулируют апоптотическую программу, а *Ki-67* и *bcl-2*, напротив, запускают деление и ингибируют апоптоз.

*Bcl-2* – представитель белков, подавляющих гибель клетки: 1) путем ингибирования каспаз через регуляцию проницаемости мембран митохондрий для цитохрома; 2) за счёт связывания фактора, активирующего апоптоз *APAF1*. *Ki-67* – маркер клеток, вступивших в митоз. *P53* – это транскрипционный белок, он стимулирует синтез проапоптотических белков и белков-регуляторов клеточного цикла, ген его является антионкогеном, а сам белок сигнализирует о том, что клетка имеет поврежденный геном и должна быть уничтожена. *FAS-R* – ключевой инициатор апоптоза.

Эти маркеры исследованы на материале 61 пациента с диагнозами: папиллярная карцинома, токсический зоб, аутоимунный тиреоидит (АИТ), аденоматозный зоб. *Ki-67*, *FAS-R*, *bcl-2* и *p53* оказались актуальны для ИГХ метода на ткани щитовидной железы, а в мазках наиболее показательны *Ki-67* и *FAS-R*. На основании их динамики был рассчитан Z-индекс злокачественности клеток в пунктате щитовидной железы, его формула расчета приведена в разделе «Материал и методы». Эта методика оценки злокачественного потенциала ткани на предоперационном этапе диагностики узловых образований опробована нами с 2020 года и в ретроспективном анализе результаты представлены в главе 6.

*Результаты расчетов уровня экспрессии маркеров Ki-67 и FAS-R в методе ИЦХ на клеточном материале мазков ТАПБ щитовидной железы.*

Полученные результаты ИЦХ окрашивания на маркер *FAS-R* оказались отличными от ИГХ. В большинстве препаратов лишь незначительное количество

тироцитов дают иммунопозитивную, чаще слабоинтенсивную окраску. В отдельных случаях обнаружены четко позитивно окрашенные ядра, что не характерно для данного маркера (рис. 24). При этом в 95% такого окрашивания ядер гистологический диагноз подтвердил наличие папиллярной карциномы.

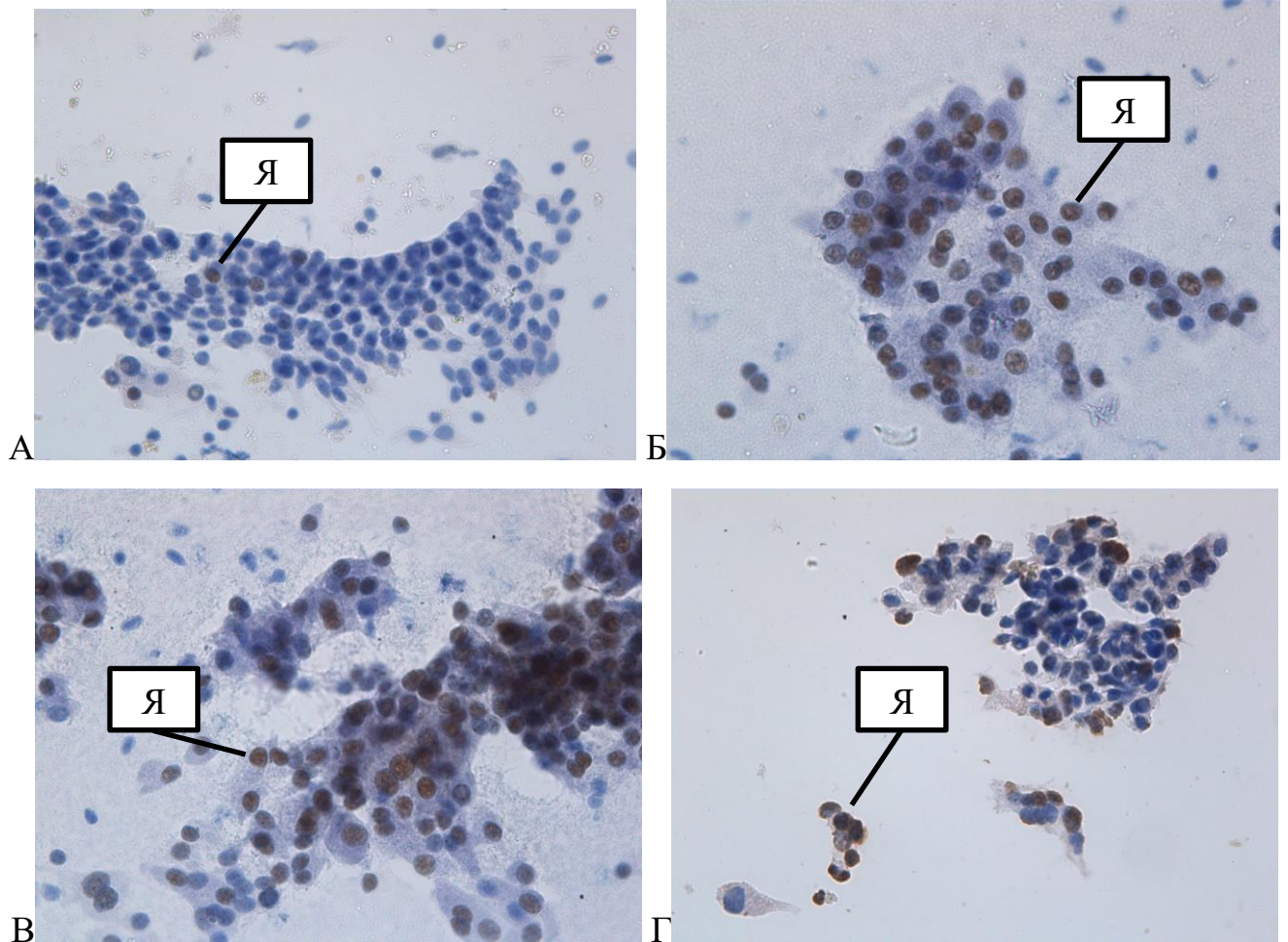


Рисунок 24. Мазки материала ТАПБ щитовидной железы человека с папиллярной карциномой. Ув. 200х. ИЦХ реакция с антителом к *FAS-R*. Обозначения: Я – ядро.

А. Окрашены единичные ядра. Низкий уровень экспрессии *FAS-R*.

Б, В Большинство ядер тироцитов иммунопозитивны. Высокий уровень экспрессии *FAS-R*.

Г. Умеренный полиморфизм ядер в виде ядер округло-овальной и овальной формы, неровными контурами ядерной мембраны. Средний уровень экспрессии *FAS-R*.

То есть это не является артефактом, а связано с интрануклеарной локализацией белка *FAS* в процессе синтеза активной части молекулы данного регулятора, взаимодействующей с антителом диагностикума.

Количество иммунопозитивных тироцитов с маркером пролиферации (*Ki-67*<sup>+</sup> клеток) редко превышает 10 в поле зрения. Наиболее высокие значения пролиферативного маркера (15-20 клеток в поле зрения) наблюдаются у пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом токсический зоб или АИТ (рис. 25). При этом такие высокие значения встречаются в «горячих» очагах и не влияют на средние показатели расчета во всем препарате пациента (рис. 25).

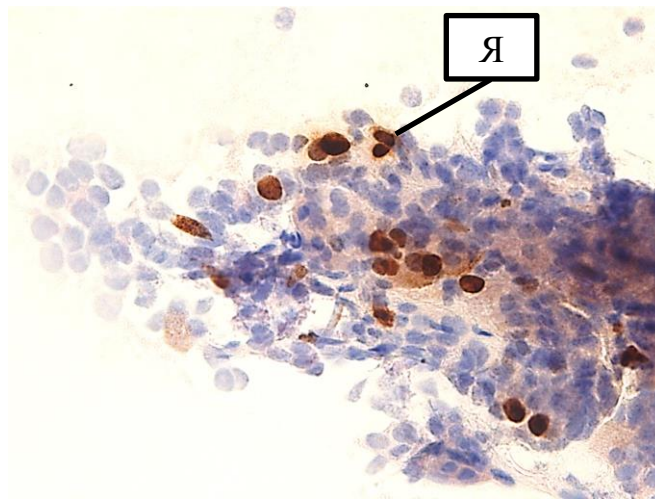


Рисунок 25. Мазок материала ТАПБ щитовидной железы человека с токсическим зобом. Ув. 200х. ИЦХ реакция с антителом к *Ki-67*. Обозначения: Я – ядро. Окрашены группы ядер. Высокий уровень экспрессии.

Попарное сравнение нозологических групп по уровню экспрессии исследуемых маркеров методом Манна-Уитни не выявило значимых отличий (табл. 13) по разным нозологическим группам.

Однако проведенный кластерный анализ (табл. 14) позволил выделить группу пациентов (кластер №3), сходную по значению обоих маркеров. У всех пациентов этой группы гистологически верифицирована папиллярная карцинома. Значения экспрессии маркеров составило 2,3-9,0 для *FAS* и 0,9-4,1 для *Ki-67*. Это послужило идеей расчета Z-индекса злокачественности. То есть была

сформулирована гипотеза о том, что соотношение числовых значений экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза на материале ТАПБ позволит вычислить индекс, который позже был назван индекс злокачественности  $Z = FAS-R / (Ki67 + 1)$ .

В кластере 3 Z-индекс варьировал в пределах 0,6-3,9.

Таблица 13. Экспрессия маркеров *Ki-67* и *FAS-R*, Z-индекс в тироцитах, в клеточном материале ТАПБ, метод ИЦХ

Диагноз	N число случаев	Маркер (m; Me [Min; Max])		
		FAS-R	Ki-67	Z-индекс
Папиллярная карцинома	31	7,2; 3,8 [0,0; 59,2]	4,4; 3,3 [0,5; 19,1]	2,8; 0,9 [0,0; 39,5]
Токсический зоб	13	2,7; 1,1 [0,0; 13,1]	3,0; 1,5 [0,0; 11,0]	0,7; 0,3 [0,0; 3,6]
Аутоиммунный тиреоидит	5	6,5; 2,0 [0,0; 26,3]	2,5; 1,4 [0,5; 5,5]	2,9; 0,9 [0,0; 11,0]
Аденоматозный зоб	12	3,4; 2,6 [0,0; 13,9]	3,7; 1,5 [0,5; 14,9]	1,1; 0,4 [0,0; 5,12]

Таблица 14 Экспрессия маркеров *Ki-67* и *FAS-R*, Z-индекс в тироцитах в клеточном материале ТАПБ, метод ИЦХ, расчет для кластеров

Кластер	1	2	3	4	5
Маркер Me [Max;Min]	n=12	n=7	n=10	n=21	n=11
FAS-R	4,67 [0,0; 15,1]	14,6 [10,5; 59,2]	4,9 [2,3; 9,0]	1,4 [0,0; 3,9]	0,0 [0,0; 2,5]
Ki-67	8,7 [6,0; 19,1]	1,6 [0,5; 2,6]	2,5 [0,9; 4,1]	1,0 [0,0; 2,0]	4,5 [3,2; 6,4]
Z	0,3 [0,0; 1,8]	5,9 [3,1; 39,5]	1,8 [0,6; 3,9]	0,8 [0,0; 2,6]	0,0 [0,0; 0,4]

В кластер 2 вошли пациенты, у которых по результатам предоперационной ТАПБ был коллоидный узел, который подтвердился гистологически у большинства пациентов этой группы. Остальные группы (кластеры) оказались более гетерогенны по диагнозу.

Затем на материале пунктатов, из тех же узлов (на мазках которых ставили описанные выше ИЦХ-реакции), были выполнены реакции на клеточном блоке. И результаты их количественной оценки по группам совпали.

Примеры визуализации этих реакций на клеточном блоке – на рисунке 26 А, Б в сравнении с ИЦХ реакцией на материале мазка 26 В, Г. Обращает на себя внимание отчетливость изображения, полученного на срезе клеточного блока (верхний ряд изображений на рис. 26), возможность получить тонкий срез, сохранность части тканевых образований (сосочковые структуры папиллярной карциномы), что облегчает оценку среза с клеточного блока, интерпретацию выявленных изменений по сравнению с оценкой мазка (нижний ряд изображений на рис. 26).

Таким образом, в связи и с другими преимуществами клеточного блока (возможность делать серийные срезы для общей цитологии, иммуноморфологии, исследований мутаций генов), этот способ можно считать приоритетным для сомнительных случаев. Иммунная реакция на клеточном блоке иногда в литературе обозначается как ИГХ, иногда как ИЦХ – оба варианта, на наш взгляд, приемлемы.

Затем были выполнены ИГХ-реакции уже на срезах из классических тканевых блоков тех же узлов. Полученные результаты ИГХ совпали с результатами, полученными на клеточных блоках, и отличаются от ИЦХ по цитоплазматическому маркеру FAS (таблица 15), что связано с техникой изготовления мазка и частого отсутствия цитоплазмы и плазмолеммы у клеток в мазке.

Как показано в таблице 15, группа больных с папиллярной карциномой демонстрирует максимальные значения маркера пролиферативной клеточной активности и минимальный процент FAS<sup>+</sup> клеток. Статистический анализ показал достоверность отличий этой группы по показателям FAS от группы больных токсическим зобом.



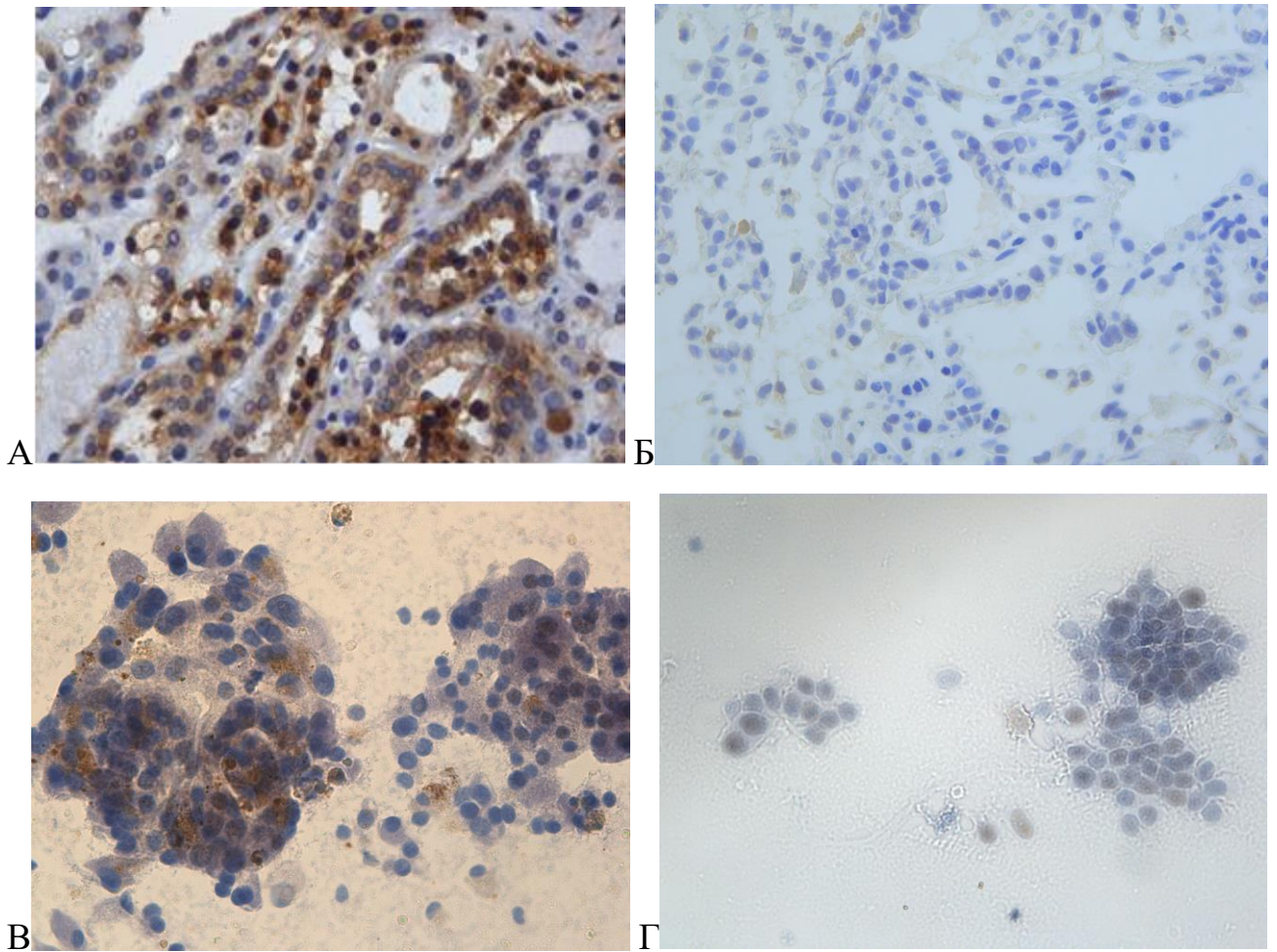


Рисунок 26. ИЦХ реакция, материал ТАПБ щитовидной железы человека. Ув. 200х. А, Б – срезы с клеточного блока, В, Г – обычный мазок.

А. ИЦХ реакция с *FAS-R* – умеренно выраженная позитивная мембранно-цитоплазматическая реакция в тироцитах. Фолликулярная аденома щитовидной железы. Пробоподготовка – cell-block.

Б. ИЦХ реакция с *Ki-67* – единичные клетки с позитивной ядерной реакцией. Папиллярная карцинома на фоне аутоиммунного тиреоидита. Пробоподготовка – cell-block.

В. ИЦХ реакция с *FAS-R* – умеренно выраженная позитивная мембранно-цитоплазматическая реакция в тироцитах. Фолликулярная аденома щитовидной железы. Пробоподготовка – классический мазок.

Г. ИЦХ реакция с *Ki-67* – единичные клетки с позитивной ядерной реакцией. Папиллярная карцинома. Пробоподготовка – классический мазок.

Таблица 15. Экспрессия маркеров *Ki-67* и *FAS-R*, *Z*-индекс в тироцитах на гистологическом материале желез, удаленных во время операции, метод ИГХ

Диагноз	N число случаев	Маркер (m; Me [Min; Max])		
		FAS-R (%)	Ki-67 (кл в 10 п/з)	Z-индекс
Папиллярная карцинома	31	52,4; 60,5 [23,5; 65,0]	4,1; 3,3 [0,3; 9,5]	21,6; 17,2 [2,2; 50,0]
Токсический зоб	13	85,0; 84,5 [75,0; 96,0]	2,7; 2,8 [0,2; 5,2]	32,5; 22,9 [13,6; 25,9]
Аутоиммунный тиреоидит	5	82,3; 82,0 [74,0; 91,0]	4,6; 4,4 [3,9; 5,6]	15,1; 15,7 [11,2; 17,5]
Аденоматозный зоб	12	78,1; 78,8 [66,0; 89,0]	4,2; 4,0 [1,3; 7,7]	20,0; 20,5 [8,7; 30,2]

Изолированная оценка ИЦХ реакций с маркерами *FAS* или *Ki-67* на материале ТАПБ не является диагностически значимой. Однако эти маркеры перспективны для использования в комплексе с цитологическими характеристиками мазка для прогностической оценки злокачественного потенциала новообразования. Так, низкие значения *FAS* и повышенные *Ki-67* на фоне отсутствия признаков АИТ свидетельствуют об активации неопластических процессов. При наличии цитологических характеристик фолликулярной опухоли, низкие показатели *FAS* и повышенные *Ki-67* сигнализируют о большей вероятности наличия фолликулярной карциномы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что дальнейшее исследование выбранных маркеров перспективно в поисках достоверных признаков дифференциальной диагностики онкопатологии щитовидной железы.

*Результаты ИГХ с маркерами Ki67, FAS-R, bcl-2 и p53 на гистологическом материале щитовидных желез, удаленных во время операции.*

Необходимо отметить высокую разнородность уровней экспрессии маркеров на операционном материале, как и на материале ТАПБ, что, собственно, и является причиной сложности молекулярной диагностики и отражает ценность расчетных индексов. Ниже проиллюстрированы классические ИГХ на ткани железы при четырех основных формах патологии для четырех исследуемых маркеров (рис. 27-30).

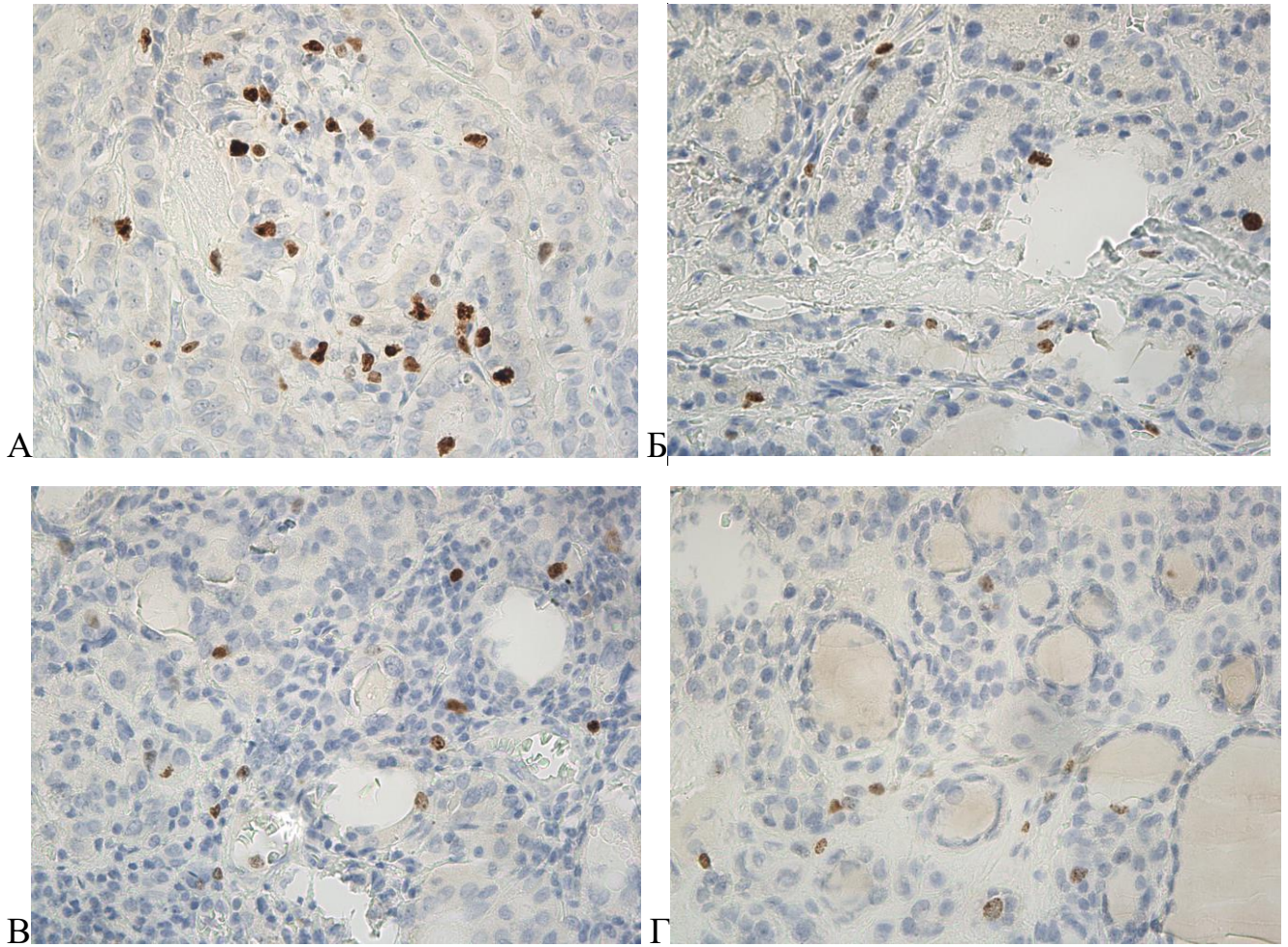


Рисунок 27. Фрагменты щитовидной железы человека с различной патологией. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к *Ki-67*. Ядра клеток, вступивших в митоз, окрашены коричневым пигментом.

- А. Папиллярная карцинома. Высокий уровень экспрессии *Ki-67*.
- Б. Токсический зоб. Средний уровень экспрессии *Ki-67*.
- В. Аутоиммунный тиреоидит. Средний уровень экспрессии *Ki-67*.
- Г. Аденоматозный зоб. Низкий уровень экспрессии *Ki-67*.

На микрофотографиях (рис. 27) показательно представлен практически идентичный уровень пролиферации тиреоидного эпителия при таких различных заболеваниях, как злокачественная трансформация (большинство форм папиллярного рака растет медленно, и в невысоком индексе нет противоречия с нозологией), аутоиммунная патология (токсический зоб, АИТ) и ТТГ-зависимый доброкачественный пролиферативный процесс (аденоматозный зоб).

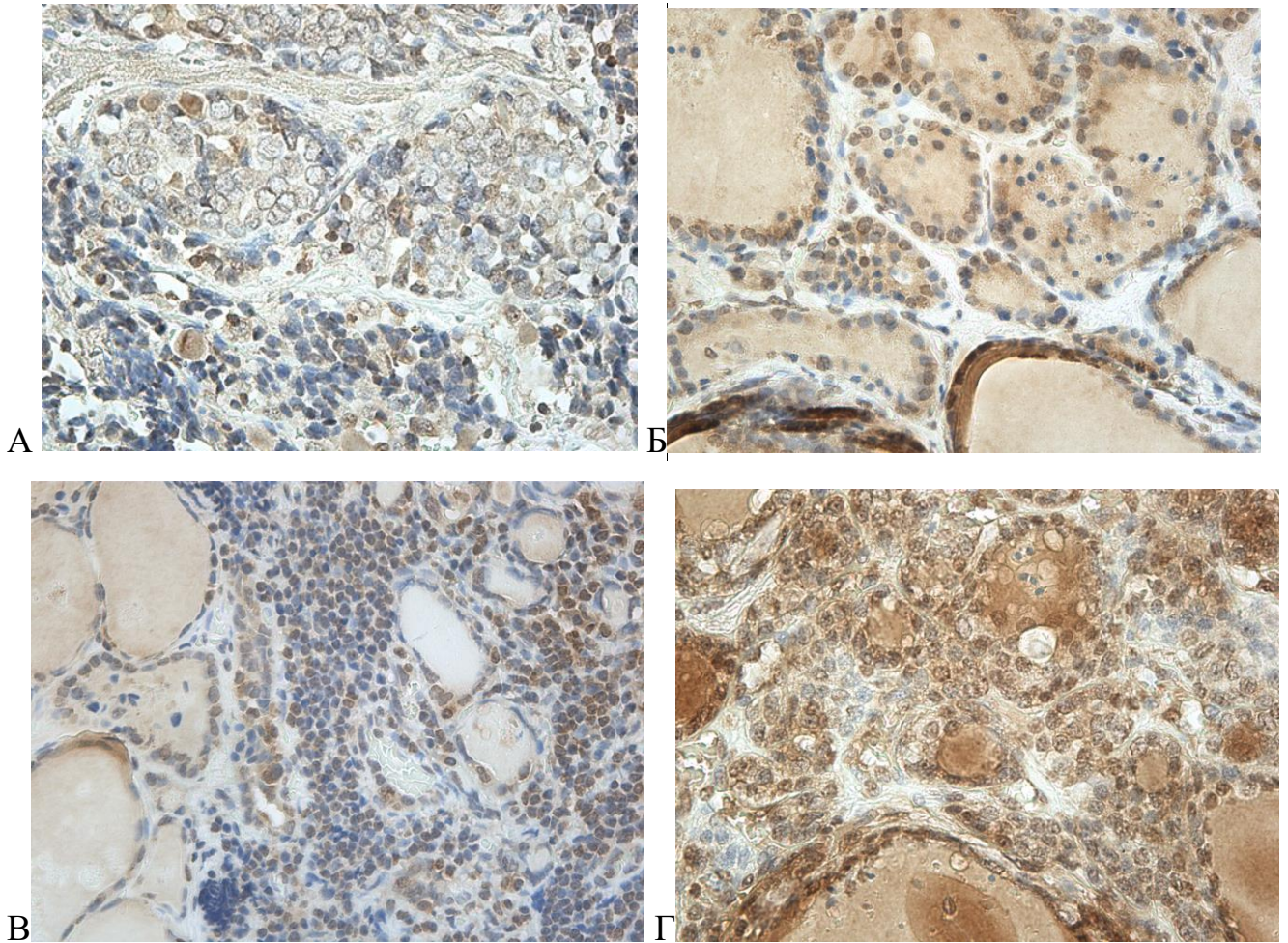


Рисунок 28. Фрагменты щитовидной железы человека с различной патологией. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к *FAS-R*. Элементы, несущие белки-факторы апоптоза в цитоплазме, мембране или ядре, окрашены коричневым пигментом.

А. Папиллярная карцинома. Низкий уровень экспрессии *FAS-R*.

Б. Токсический зоб. Средний уровень экспрессии *FAS-R*.

В. Аутоиммунный тиреоидит. Низкий уровень экспрессии *FAS-R*.

Г. Аденоматозный зоб. Высокий уровень экспрессии *FAS-R*.

Рис. 28 демонстрирует различные уровни экспрессии маркера апоптоза и различную локализацию реакции. Клетки папиллярной карциномы зачастую *FAS*-негативны, а бывают, напротив, резко позитивные типы по *FAS-R* опухоли. Различные зобы бывают активно и менее активно пролиферирующими, но апоптотические маркеры в них, как правило, активно экспрессируются.

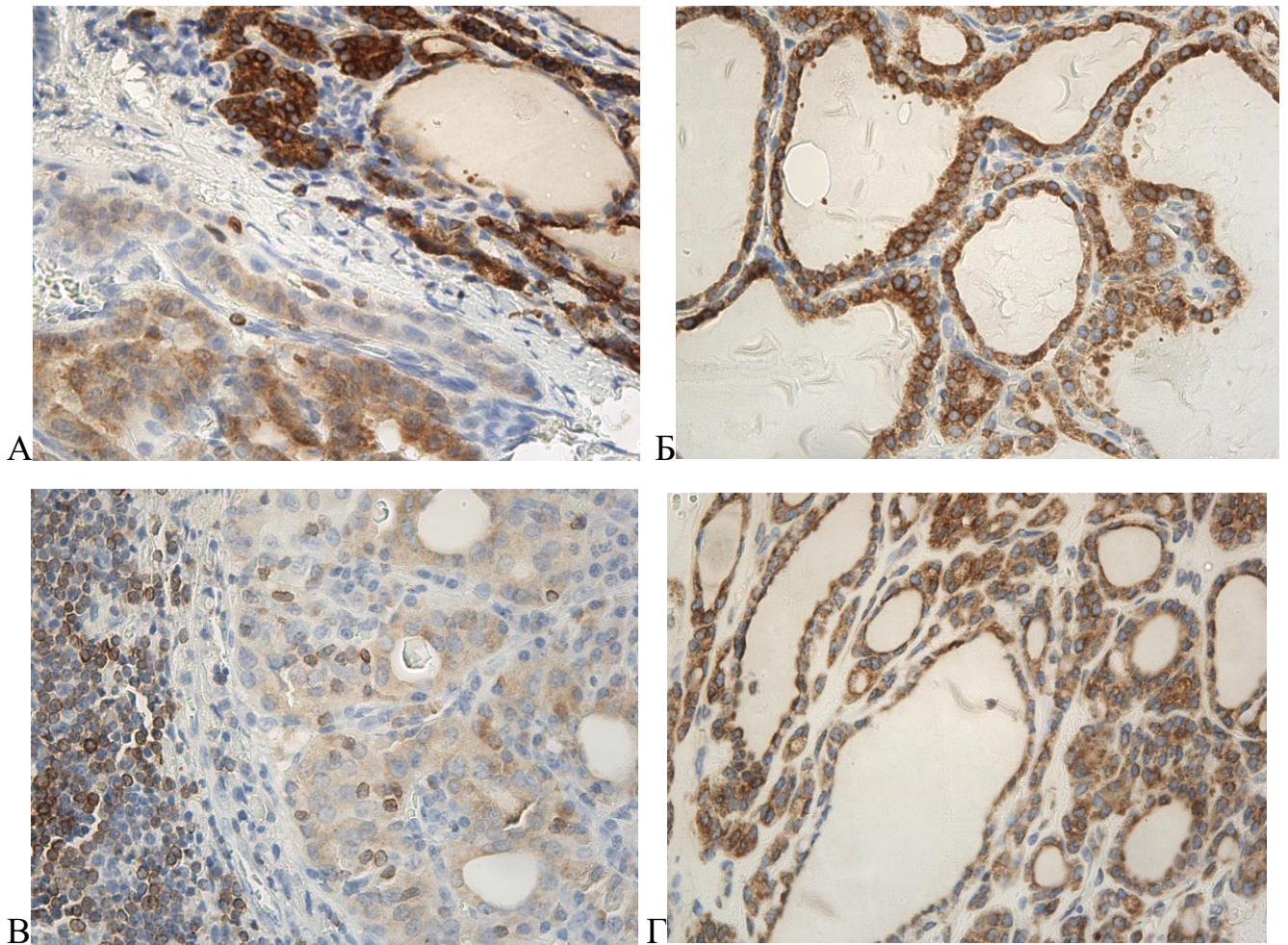


Рисунок 29. Фрагменты щитовидной железы человека с различной патологией. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к *bcl-2*. Элементы, экспрессирующие антиапоптотические факторы в цитоплазме окрашены коричневым пигментом.

А. Папиллярная карцинома. Очагово очень высокий и средний уровень экспрессии *bcl-2* в разных популяциях тироцитов.

Б. Токсический зоб. Высокий уровень экспрессии *bcl-2*.

В. Аутоиммунный тиреоидит. Средний уровень в клеточном инфильтрате и низкий уровень экспрессии в тироцитах *bcl-2*.

Г. Аденоматозный зоб. Высокий уровень экспрессии *bcl-2*.

Возможно гиперэкспрессия антиапоптотического фактора является важным качеством трансформированной клетки, защищающей ее от гибели путем

активации различных путей апоптоза (рис. 29 А демонстрирует высокую цитоплазматическую экспрессию в трансформированных тироцитах).

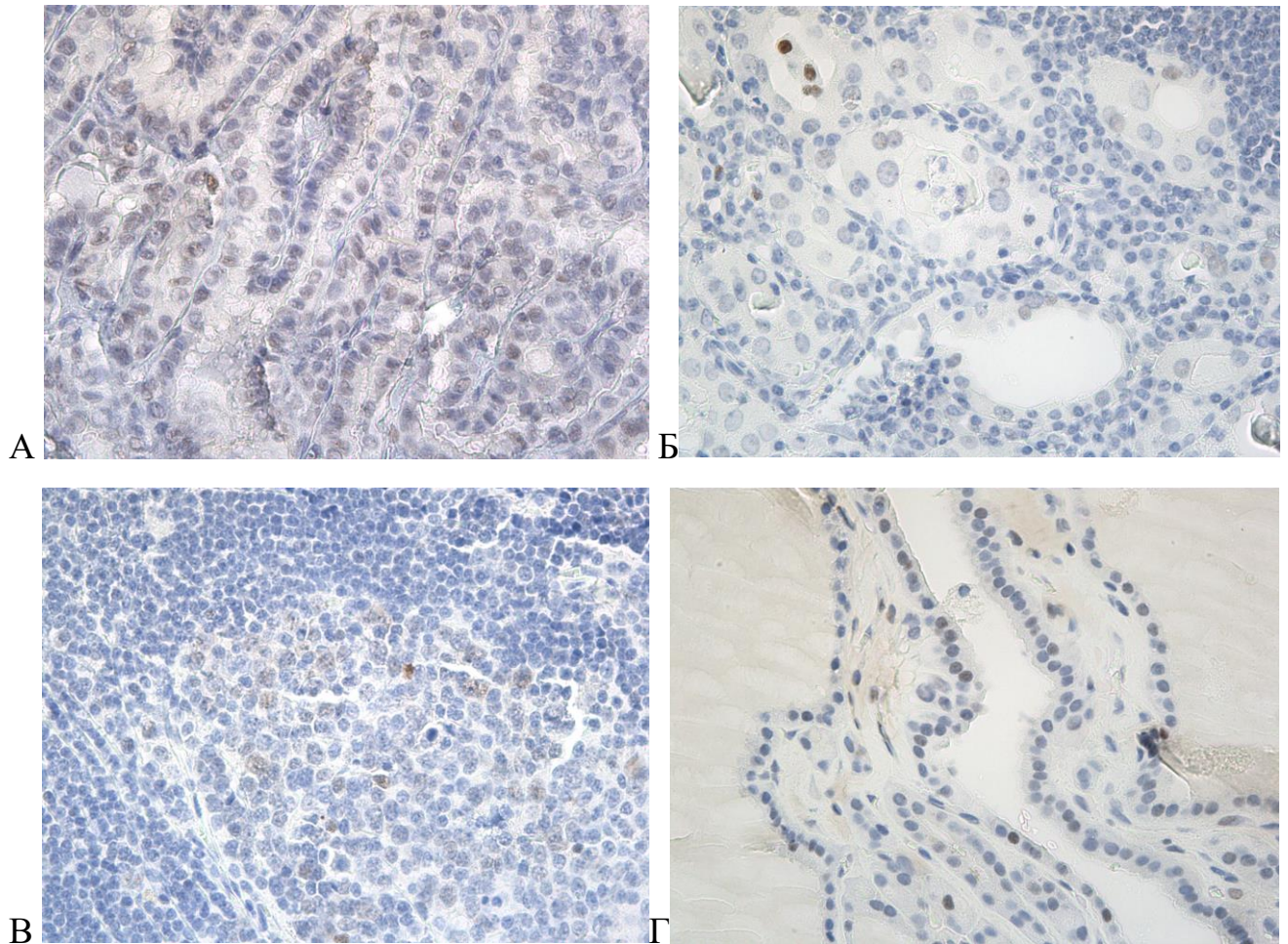


Рисунок 30. Фрагменты щитовидной железы человека с различной патологией. Парафиновые срезы. Ув. 200х. ИГХ реакция с антителом к *p53*. Клетки, имеющие в цитоплазме белок *p53*, окрашены коричневым пигментом.

А. Папиллярная карцинома. Средний уровень экспрессии *p53*.

Б. Токсический зоб. Низкий уровень экспрессии *p53*.

В. Аутоиммунный тиреоидит. Низкий уровень экспрессии *p53*.

Г. Аденоматозный зоб. Низкий уровень экспрессии *p53*.

В отличие от антиапоптотического маркера, *p53* в злокачественных новообразованиях железы, как правило, положительный.

Таким образом, разнонаправленная экспрессия основных маркеров митоза и апоптоза выявлена и в ткани щитовидной железы стрессированных лабораторных крыс, и на материале ТАПБ у пациентов с папиллярной карциномой, токсическим зобом, АИТ и аденоматозным зобом при постановке ИЦХ реакции на мазке и срезе клеточного блока. Математический подсчет позволил вывести закономерность, указывающую, что именно соотношение числовых значений экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза на материале ТАПБ позволяет вычислить на дооперационном этапе индекс, отражающий злокачественный потенциал узла по формуле  $Z = FAS-R / (Ki67 + 1)$ , являющийся важным дополнительным критерием в ряде сомнительных диагностических случаев.

То есть, не смотря на отсутствие прямой связи между экспрессией отдельных маркеров клеточного цикла в ткани железы и нозологией, при расчёте соотношения уровней экспрессии наиболее распространенных в диагностике маркеров митоза и апоптоза есть группы (кластеры) случаев, перспективные для оценки уровня злокачественности ткани. И крайне важно, что благодаря методике клеточного блока, этот метод доступен на предоперационном этапе и не исключает возможность параллельного выполнения МГИ-диагностики на выявление мутации *BRAFV600E* (при показаниях).

## **ГЛАВА 6. ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ**

В этом разделе мы поставили задачу описать способ дооперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узловых образований щитовидной железы, разработанный в ЦНИЛ Института «Медицинская академия им. С. И. Георгиевского», ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, апробированный и внедрённый в диагностику в 2020-2022 гг.

В данном разделе приведен и описан алгоритм диагностической работы с пациентом, включающий и молекулярные способы диагностики (ИГХ с маркерами клеточного цикла и МГИ выявление значимой мутации в ткани опухоли). Также изложены результаты ретроспективного анализа использования данного алгоритма на практике в отделении эндокринной хирургии онкологического стационара Клинического медицинского многопрофильного центра Святителя Луки (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь.

Раздел 5 продемонстрировал, что наиболее удобны для молекулярных методов гистологические препараты (парафиновые блоки), а на предоперационном этапе их с успехом заменяют клеточные блоки, дающие возможность ставить реакции с наборами антител и тест-систем разных маркеров, последовательно строя диагностическое суждение и получая воспроизводимый результат.

Мы разработали подход (рис. 31) для верификации сомнительных цитологических изменений, например, таких как, папиллярные структуры, плазмощитоидность цитоплазмы, наличие внутриядерных борозд, нагромождение ядер и их укрупнение путем постановки ИЦХ реакции, по сути являющейся ИГХ методом на cell-block.



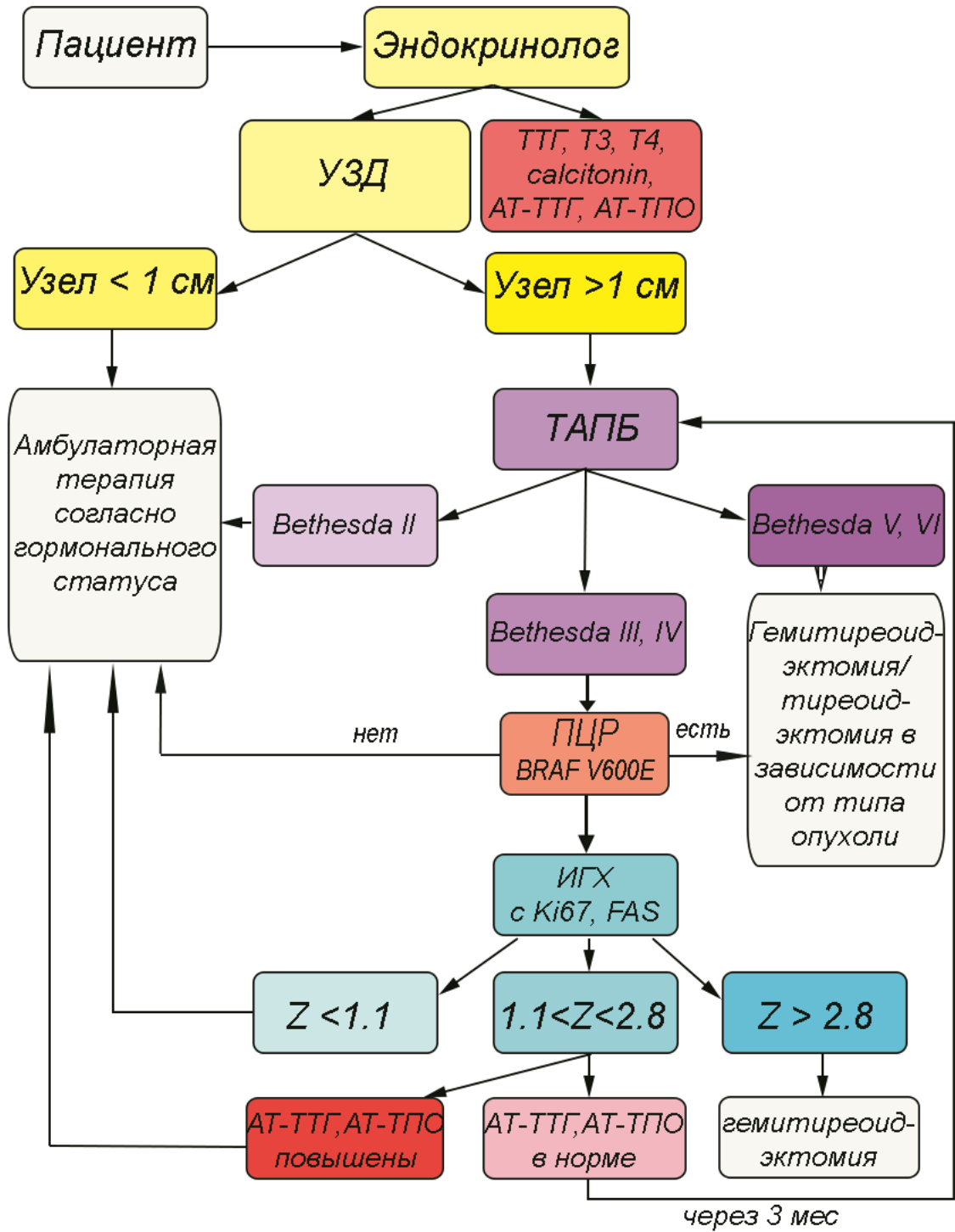


Рисунок 31. Алгоритм морфологической диагностики узловых образований щитовидной железы.

*Описание диагностического алгоритма.*

Все пациенты, участвовавшие в исследовании, дали на это письменное добровольное информированное согласие.

При подозрении на опухоль щитовидной железы под контролем УЗИ выполняют ТАПБ, при заполнении направления на цитологическое исследование указывают описание локализации и ультразвуковых характеристик узла. Материал биопсии доставляют в лабораторию в шприце в течение 30 минут после взятия, и сразу же после поступления содержимое шприца выдавливают в пробирку-эппендорф и берут в работу. Для этого пунктат фиксируют, промывают, взвесь клеток помещают в стеклянную пробирку, добавляют 500 мкл цитратной плазмы и 5 мкл хлорида кальция, инкубируют в термостате 15-20 минут при 37°C, формируя тромбиновый сверток как связующую основу, далее обезвоживают и пропитывают парафином, изготавливают срезы по стандартной методике.

Для верификации сомнительных цитологических изменений, например, таких как, папиллярные структуры, плазмоцитоплазматичность цитоплазмы, наличие внутриядерных борозд, нагромождение ядер и их укрупнение, проводят иммуноцитохимическую реакцию с двумя маркерами на клеточном блоке cell-block. Ставят реакцию с маркером пролиферации Ki-67 и с апоптотическим маркером Fas-R. Данный этап выполняют по стандартной методике, включающей депарафинизацию, промывку, обработку первичным антителом, обработку системой детекции, демаскировку, окрашивание ядер, промывку и заключение под стекло.

По полученным значениям уровней экспрессии маркера Ki-67 и маркера Fas-R в абсолютных числах определяют злокачественный потенциал опухоли путем вычисления индекса злокачественности  $Z$  по формуле:  $Z = \text{Fas-R} / (\text{Ki-67} + 1)$ , где Fas-R – среднее количество позитивных клеток, окрашенных маркером апоптоза, Ki-67 – среднее количество позитивных клеток, окрашенных маркером пролиферации, по 10 полям зрения в препарате.

При подозрении на наличие мутации BRAF в гене V600E делают парафиновую стружку из материала клеточного блока, выполняют экстракцию ДНК, и методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК определяют искомую мутацию.

При величине индекса Z менее 1,1 и отсутствии мутации BRAF в гене V600E судят о низком риске злокачественного роста. При этом рекомендуют динамическое наблюдение пациента с повторной ТАПБ в случаях увеличения размеров узла или изменения его эхогенности.

При величине индекса Z более 2,8 или (и) выявлении мутации BRAF в гене V600E делают заключение о высоком риске злокачественного роста, ассоциированном с развитием агрессивного типа опухоли.

При гипоехогенности узла, а также нормальных показателях антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО), антител к тиреоглобулину (АТ-ТГ) и величине индекса Z более 2,8 рекомендуют гемитиреоидэктомию с ревизией региональных лимфоузлов.

При подозрении на метастатическое поражение по данным УЗИ, КТ, МРТ – рекомендуют регионарную лимфодиссекцию с тиреоидэктомией.

В случаях изоэхогенных ультразвуковых характеристик узла, наличии биохимических показателей аутоиммунного тиреоидита АТ-ТПО, АТ-ТГ и величине индекса Z более 2,8 рекомендуют проведение жидкостной цитологии для исключения папиллярной карциномы.

Если величина индекса Z составляет 1,1-2,8, то судят о среднем риске злокачественного роста опухоли. Рекомендуют при этом повторную ТАПБ с исследованием на наличие мутации V600E гена BRAF в опухолевых клетках, и в случае подтверждения опухолевой трансформации клеток – оперативное вмешательство, гемитиреоидэктомию.

Таким образом, клеточный блок позволяет использовать широкий спектр дополнительных исследований, делая доступными молекулярные методики из биоматериала опухоли уже на предоперационном этапе при использовании пунктата, взятого из узлового образования железы под контролем ультразвукового метода.

Использование этого способа дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы дает возможность исключить риск врачебной ошибки в выборе тактики ведения пациентов в сомнительных случаях.

Данный способ дифференциальной диагностики был применен у 61 пациента (как мужчины, так и женщины) возрастом от 30 до 75 лет, которые обратились в клинику эндокринной хирургии.

На основании анализа количества достоверно положительных, ложно - и достоверно отрицательных диагнозов по четырем нозологическим группам (Папиллярная карцинома (n=29), Токсический зоб (n=13), Аутоиммунный тиреоидит (n=5), Аденоматозный зоб (n=12) чувствительность заявляемого способа показала 96,80 %, и специфичность - 96,17%. При этом у 38% пациентов с папиллярной микрокарциномой выявлена мутация BRAF в гене V600E. Применение предложенного способа дополнительно к стандартным методам исследования, таким как УЗИ и цитологическое исследование позволяет улучшить дооперационную диагностику и осуществить дальнейший выбор адекватного метода лечения.

Предложенный способ обеспечивает повышение достоверности верификации опухолевых поражений щитовидной железы и может быть эффективно использован для диагностики опухолей в дооперационном периоде у больных с узловыми заболеваниями щитовидной железы для выбора адекватного метода лечения.

Также, после внедрения в практику, мы провели *ретроспективный анализ* эффективности и результативности данного алгоритма при его внедрении для диагностики хирургических заболеваний щитовидной железы.

Важным фактом, который необходимо отметить является выраженный стресс, которому подвергались пациенты (по данным анамнеза), обратившиеся в период пандемии и в 2022 году. Это связано с социально-экономическими факторами, ограничениями перемещения, изменением привычного образа жизни, неизвестностью, страхом за здоровье свое и близких людей, потерями различного

рода, изменением привычных жизненных обстоятельств. И этот стрессовый фактор влияет на популяцию, как мужчин, так и женщин, в равной мере.

Выполнить большое ретроспективное исследование без учета глобальных политических и экономических реалий не представляется возможным. В нашем случае пандемия и ряд других событий стимулировали развитие стресса у жителей Крымского региона, попавших в выборку данной работы. На структуру заболеваемости вероятней всего оказала эффект пандемия и стрессовое воздействие. А на раннее и точное выявление – диагностический алгоритм.

Всего было включено 1244 случая (828 исследований пунктов ТАПБ и 416 тиреоидэктомий больных хирургической патологией щитовидной железы). Данные пациентов представлены в таблицах 16 и 17.

Таблица 16. Результаты цитологии материала аспирационной биопсии узловых образований щитовидной железы в разные периоды

Группа за период времени	Количество обследованных (n)	Распределение (в %) по Bethesda Thyroid Classification					
		I	II	III	IV	V	VI
1 (до)	80	18,8	72,5	0,0	3,8	0,0	5,0
2 (во время)	561	9,4	76,5	3,0	3,6	1,4	6,1
3 (после)	187	5,9	77,5	6,4	4,3	2,7	3,2

*Примечания:* Группа 1 – до разработки алгоритма, 2 – в период разработки и апробации, 3 – после внедрения в практику и применения.

По стечению обстоятельств периоды развития пандемии COVID-19 в Крыму совпадают с этапами исследования: 1 группа – до разработки алгоритма (до пандемии), 2 – в период разработки и апробации (в период пандемии), 3 – после внедрения в практику и применения (после завершения пандемии).

Суммарно растет процент узловых образований, требующих оперативного вмешательства по причине подозрения на атипию или с достоверными признаками рака (III-VI категории по Bethesda) от 8,8% в 1 группе пациентов, до

14,1% во второй и 16,6% в третьей. При сравнении этих цифр по критерию  $\chi^2$  значимость изменений высокая, а вероятность ошибки не более 0,0003.

Таблица 17. Данные о пациентах с заболеваниями щитовидной железы, прошедших оперативное лечение в разные периоды

Группа	Число операций (n)	Средний возраст $\pm$ sd			% рака среди всех нозологий		
		все пациенты	мужчины	женщины	все пациенты	мужчины	женщины
1 (до)	93	51,9 $\pm$ 14,4	48,6 $\pm$ 17,1	52,2 $\pm$ 13,9	38,7	55,6	36,9
2 (во время)	252	51,8 $\pm$ 14,0	52,4 $\pm$ 11,8	51,6 $\pm$ 14,1	31,0	25,0*	30,6
3 (после)	71	51,2 $\pm$ 10,6	41,4 $\pm$ 5,4	51,8 $\pm$ 10,7	40,8**	20,0*	42,4**

*Примечание:* \* - значимо по отношению к группе 1, \*\* - к группе 2.

Количество женщин-пациенток клиники эндокринной хирургии с заболеваниями щитовидной железы больше, чем мужчин, разница в 10-24 раза в различные периоды. Средний возраст женщин составляет 51 год, мужчин – 47 лет. Это может свидетельствовать о преимуществе гендерных факторов влияния (а именно возраста прекращения женских репродуктивных циклов) на возраст развития болезней щитовидной железы у женщин. Обращает на себя внимание рост выявления рака щитовидной железы среди всех пациентов в группе 3: на 2,1% рак в 2022 году выявляется чаще по сравнению с группой 1 и на 9,8% ( $P=0,045$ ) – по сравнению с группой 2. Это изменение соотношения доброкачественных и злокачественных заболеваний в пользу последних характерно для женщин, составляющих подавляющее большинство пациентов эндокринных хирургов, но в отличие от женщин, у мужчин тенденция прямо противоположная. У мужчин в более чем половине случаев поводом к оперативному вмешательству на щитовидной железе в 2019 году являлся рак, а в позже появляются другие конкурирующие заболевания железы, требующие хирургического вмешательства, снижающие удельный вес рака с 55,6% до 20% ( $P\leq 0,001$ ). Этот факт, на наш взгляд, свидетельствует о влиянии пандемии COVID-19, а не техники и методики работы. Но другие показатели демонстрируют улучшение качества диагностики и эффективности оперативного

лечения, снижение активности которого (из-за ограничений) в период пандемии отмечают большинство специалистов тиреоидной хирургии в мире [66].

Более подробно нозологические формы выявленных на операции болезней щитовидной железы представлены в таблице 18.

Таблица 18. Частота основных нозологических форм заболеваний щитовидной железы в разные периоды

Группа	Распределение (в %) по нозологическим формам										
	КЗ	АИТ	ТЗ	ТА	ФА	В-кл А	ПР	ПРФ	ПРВ	ПРМ	МР +
1 (до)	20,4	5,4	10,8	2,2	17,2	5,4	22,6	8,6	2,2	2,2	3,2
2 (во время)	14,3	7,1	26,6*	2,8	15,9	2,4	21,4	6,0	1,2	0	2,4
3 (после)	15,1	5,5	12,3**	0	19,2	8,2**	32,9***	4,1	0	1,4	1,4

*Примечания:* КЗ – коллоидный зоб (плюс варианты аденоматозный и многоузловой), АИТ – аутоиммунный тиреоидит (плюс тиреоидит Риделя), ТЗ – токсический зоб, ТА – токсическая аденома, ФА – фолликулярная аденома, В-кл А – В-клеточная аденома (Гюртлеклеточная, онкоцитарная), ПР – папиллярный рак, ПРФ – папиллярный рак, фолликулярный вариант, ПРВ – В-клеточный (Гюртлеклеточный) вариант папиллярного рака, ПРМ – метастаз папиллярного рака, МР – медуллярный рак и низкокодифференцированная злокачественная опухоль.

\* - значимо по отношению к группе 1, \*\* - к группе 2.

Результаты послеоперационного этапа демонстрируют три ключевые тенденции за изученный период, в связи с пандемией COVID-19 и изменением диагностического алгоритма: 1) обратимо увеличилось количество операций по поводу токсического зоба (более чем в 2,5 раза) ( $P \leq 0,001$ ); 2) менее заметно, но необратимо в исследуемом периоде начался рост доли злокачественных опухолей, для папиллярного рака на 10,3% ( $P = 0,005$ ); 3) увеличилась частота встречаемости В-клеточных аденом (онкоцитарных или Гюртлеклеточных) ( $P \leq 0,001$ ).

Таблица 18 в целом отражает динамику заболеваемости в женской популяции. А у мужчин прирост заболеваемости связан с более частым выявлением фолликулярных аденом и (также как и у женщин) – токсического зоба и разных форм рака, в том числе низкодифференцированного.

Таблица 19 отражает особенности злокачественных новообразований.

Таблица 19. Результаты гистологии злокачественных новообразований щитовидной железы в разные периоды

Группа относительно пандемии	Средний размер узла (см) ± sd	Данные микроскопии среди всех форм рака (в %)						
		микрокарцинома	tallcell высокие клетки	инвазия рака в капсулу	прорастание капсулы	мультицентрический рост	метастазы в лимфатически узлы	ангиоинвазия
1 (до)	1,2 ± 0,6	13,9	8,3	16,7	19,4	25,0	25,0	16,7
2 (во время)	1,0 ± 0,8	39,5*	5,3	3,9*	11,8	11,8*	15,8*	10,5*
3 (после)	1,4 ± 0,8	31,0*	0,0	10,3**	6,9*	13,8**	31,0**	3,4*

*Примечание:* \* - значимо по отношению к группе 1, \*\* - к группе 2.

Средний размер узлов, как правило, меньше в группе пациентов, перенесших операцию во время пандемии с противоположной тенденцией после завершения пандемии, когда средний размер узла вырос. Это сопровождается ростом числа микрокарцином как во время пандемии, так и после нее по сравнению с 2019 годом. В постпандемический период выявлено одновременное увеличение и числа микрокарцином (в 2,5 раза по сравнению с 2019 годом) ( $P \leq 0,001$ ) и рост среднего размера узла. Это свидетельствует о двух разнонаправленных тенденциях: как о приросте пациентов с вновь появившимися новообразованиями и более раннем их обращении к врачу в связи с жалобами и манифестацией заболевания, лучшей и более качественной диагностикой, так и о наличии категории пациентов, отложивших визит в хирургическую клинику в связи с пандемией. Рано обратившиеся пациенты обеспечили статистику снижения частоты большинства показателей экстраатиреоидного распространения опухолей – инвазия и прорастание в капсулу ( $P \leq 0,05$ ), ангиоинвазия в 2021-2022 годах резко меньше, чем в 2019 году. Но это не касается метастазирования в



лимфатические узлы – совместно с группой пациентов, не прооперированных вовремя, они демонстрируют прирост числа случаев с метастазами в лимфатические узлы.

Если оценить данные удаленных опухолей по классификатору TNM, обращает на себя внимание следующее: минимальное число опухолей, прооперированных на стадии 1 было в период до пандемии, резко сократившей число операций на стадии 3 и 4 (рис. 32)

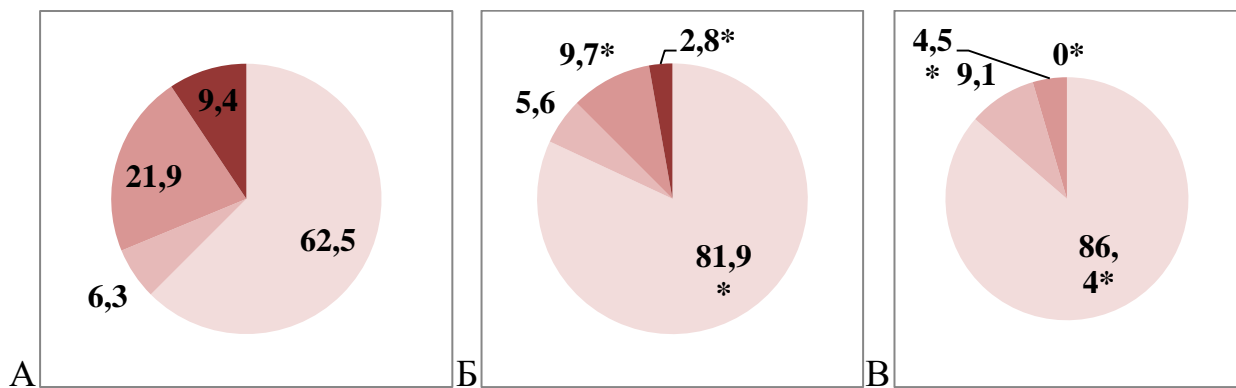


Рисунок 32. Распределение всех прооперированных опухолей по группам, выделенным исходя из размера опухоли по TNM. А – группа 1; Б – группа 2; В – группа 3. Интенсивность заливки пропорциональна размеру 1 2 3 4.

Можно предположить, что это связано с актуализацией вопросов здоровья в пандемию, появлением соматической симптоматики болезни щитовидной железы, ее метаболическими и кардиологическими проявлениями, манифестировавшими на фоне заболевания новой коронавирусной инфекцией или стресса, побудившими пациентов обратиться к врачу, где дополнительной своевременной находкой стала опухоль. Мы полагаем, что ключевое изменение количественных данных заболеваемости разными формами тиреоидной патологии связано с новой коронавирусной инфекцией, ее лечением и осложнениями болезни, а также побочными эффектами терапии; снижением активности клеточного иммунитета, стрессом и затруднением быстрой своевременной госпитализации в

эндокринологический хирургический стационар у той категорий пациентов (небольшая группа), где были выявлены опухоли на поздних стадиях.

Однако, не менее значимо и улучшение техники и методики диагностической работы.

Обобщенную картину динамики злокачественных опухолей отражает комплексная диаграмма (рис. 33).

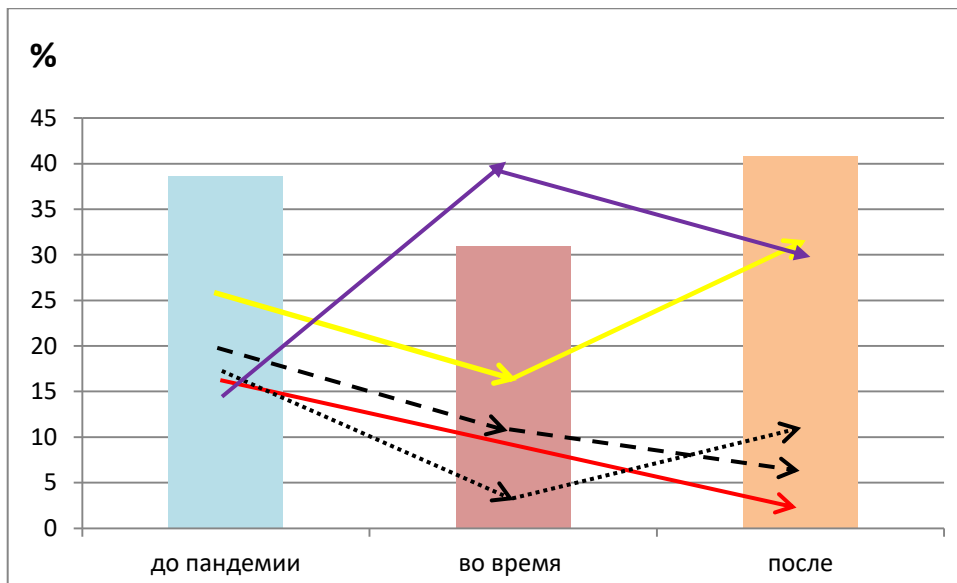


Рисунок 33. Процент выявления рака щитовидной железы (суммарно все формы) среди пациентов, прооперированных до, во время и после пандемии, а также частота выявления микрокарцином, экстраатиреоидного распространения и метастазирования.

Столбцы указывают процент рака среди всех операций, а стрелки – частоту микрокарцином (сиреневые стрелки), метастазирования в лимфатические узлы (желтые стрелки), ангиоинвазию (красные стрелки), инвазии (мелкий черный пунктир) и прорастания капсулы щитовидной железы (крупный черный пунктир).

В целом во время пандемии COVID-19 произошло не сокращение, а напротив, увеличение числа тиреоидэктомий по поводу доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы. Во время пандемии не

наблюдалось большей доли агрессивных опухолей. Тем не менее, этот аспект следует тщательно контролировать, поскольку задержка в программах скрининга и плановых обследованиях может привести к увеличению количества пропущенных диагнозов и числа агрессивных опухолей. Учитывая новую эскалацию пандемии на момент написания работы, настоятельно рекомендуется пациентам не откладывать программы скрининга и плановые визиты.

Таким образом, ретроспективный анализ показал, что выявлен рост процента узловых образований, требующих оперативного вмешательства по причине подозрения на атипию или с достоверными признаками рака, после начала эпидемии, совпавшего с периодом внедрения алгоритма. Установлен обратимый рост количества операций по поводу токсического зоба и необратимый рост доли злокачественных опухолей (особенно папиллярного рака); увеличение частоты встречаемости В-клеточных аденом; преобладание более дифференцированных форм рака с низким прогнозом риска, а также опухолей на более ранних стадиях роста.

## ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наша гипотеза заключалась в том, что стресс индуцирует молекулярные, клеточные и тканевые реакции фолликулярного аппарата щитовидной железы, ведущие к аутоиммунной и гиперпластической патологии по механизму, индуцированному динамикой синтеза и экспрессии FAS-R рецепторов, активация которых запускает апоптоз. Дальнейшие изменения происходят на фоне нарушенной клеточной кинетики и развиваются по различным направлениям в зависимости от особенностей стрессового воздействия.

Задачи экспериментальной части заключались в следующем: 1) показать у животных наличие стресс-реакции в ответ на экспериментальное воздействие; 2) подтвердить предполагаемые нами патогенетические сдвиги на тканевом и молекулярном уровне на морфологическом материале щитовидной железы.

Ограничение возможности движения как фактор стресса интересно с точки зрения физиологии животных и человека. Комбинированный стресс – ограничение подвижности животных при дефиците в пище важных нутриентов актуален для моделирования в эксперименте ситуаций, возможных у человека. Пример комбинации факторов – проживание в йододефицитном регионе, стресс и неполноценное питание – самый распространенный фон для развития тяжелых болезней щитовидной железы у жителей (чаще – жительниц) Крыма [10, 14].

Для уточнения роли стресса в патогенезе тиреоидной патологии, мы воссоздали данную модель в хроническом эксперименте на лабораторных грызунах, а изменения подтвердили при помощи лейкоцитарной формулы.

При проведении *физиологического мониторинга* за состоянием животных, подвергнутых стрессу, мы выявили связанные между собой закономерности регуляции жизненно важных функций и изменений системы крови. Известно, что сердечно-сосудистая система животных является одной из наиболее сенситивных систем организма к изменению параметров как внутренней, так и внешней среды. При этом наиболее реактивным параметром ответа на данные воздействия

является изменение характеристик сердечного ритма. Согласно литературным данным [156, 157] нормальные значения ЧСС у лабораторных животных находятся в диапазоне 300-600 ударов в минуту. В литературе [158, 162] неоднократно описаны случаи увеличения ЧСС при воздействии как острого, так и хронического стресса на организм животных.

В наших опытах 21-дневное воздействие гипокинетического стресса как на фоне нормального питания, так и при длительном ограничении питания, оказывает выраженный патогенный эффект на показатели кардиореспираторной системы у лабораторных животных. Зафиксировано стойкое прогрессирующее увеличение ЧСС, снижения ЧДД и глубины дыхания, а также снижение процентного содержания кислорода в крови самок и самцов крыс.

Биологическая саморегуляция организма и широкие возможности адаптации у млекопитающих реализуются благодаря наличию *крови как ткани, способствующей передаче информации внутри системы и принимающей в его реактивности непосредственную роль*. В связи с этим, лейкоцитарная формула является классическим показателем неспецифических адаптационных реакций организма [49, 50]. В физиологическом эксперименте нами изучена лейкоцитарная формула крыс, а также состояние красной крови и тромбоцитарного компонента гемограммы. При этом на основании критериев Гаркави-Квакиной формула белой крови демонстрирует и подтверждает стадию стресса для интерпретации результатов других методов исследования. В нашей работе она выявила достоверные различия между группами с изолированным и комбинированным стрессом, а также особенности стресс-реакции, связанные с полом. Индекс Гаркави подтвердил прогрессирование стресса в каждой группе крыс с нарастанием длительности испытания, когда его показатели снизились до минимальных критических значений у животных на третьей неделе комбинированного стресса. Считают, что индекс Гаркави отображает не только оценку стрессового состояния, адаптационных реакций тренировки и активации. Его можно трактовать и для оценки взаимоотношения гуморального и клеточного звеньев иммунитета, рассматривать как показатель сбалансированности ответной

реакции клеток крови на воспалительный процесс. Понижение индекса Гаркави является негативным маркером при наличии воспаления в связи с намечающейся тенденцией к незавершенности иммунных реакций.

При изолированном стрессе мы наблюдали незначительное увеличение палочкоядерных нейтрофилов, как у самцов, так и у самок, что возможно объясняется еженедельным ранением венозного сплетения дна полости рта при взятии крови. У крыс, подвергавшихся комбинированному стрессу палочкоядерный «сдвиг» более выражен, причем у самок рост палочкоядерных нейтрофилов в разы больше, чем у самцов и больше, чем у крыс, стрессированных монофактором. Нейтрофильный ответ — самый первый на бактериальные инфекции, при острых воспалительных процессах он всегда предшествует более специфическому лимфоцитарному.

По результатам эксперимента у крыс всех групп можно наблюдать тенденцию к лимфопении, причем данные изменения в большей степени характерны для самок, находящихся в условиях комбинированного стресса. Это говорит об угнетении основного как клеточного, так и гуморального звена иммунной системы экспериментальных животных.

Ожидаемой эозинофилии, как и угнетения базофилов в крови экспериментальных животных, мы не наблюдали, хотя тенденция прослеживалась у самцов и самок при изолированном стрессе.

Таким образом, при гиподинамическом стрессе понижается количество лейкоцитов, лимфоцитов и повышается количество гранулоцитов, результаты наших опытов сходятся с результатами исследований других авторов [162-164], указывающих на увеличение активности нейтрофилов и получены схожие данные в динамике лейкоцитарной формулы крови при иммобилизации у крыс.

К физиологическому увеличению количества эритроцитов могут приводить интенсивные физические нагрузки, стрессы, обезвоживание, недостаточность функции коры надпочечников. Эритроциты понижены при: кровопотере, гемолизе, дефиците железа, дефиците витамина В-12, дефиците фолиевой

кислоты. Здесь перечислены те факторы, которые частично или в совокупности могли повлиять на экспериментальных животных в наших опытах [162-164].

Ряд авторов считает, что по количеству клеток белой крови можно косвенно оценивать не только общую реактивность организма на стресс, но и *функциональное состояние желез внутренней секреции*. Так, снижение числа базофилов часто указывает на снижение активности щитовидной железы, а рост количества эозинофилов говорит об угнетении деятельности коры надпочечников или ее истощении [160-163]. В наших исследованиях мы получили статистически значимые отличия в содержании уровня кортизола, кортикостерона, тироксина и ТТГ в крови крыс, несмотря на высокую вариативность этих показателей. Особенно оказались показательными результаты исследования ТТГ и свободного  $T_4$ . Данное обстоятельство, наряду с падением лейкоцитарного индекса, позволяет сделать выводы о снижении компенсаторных возможностей нейроэндокринной системы организма животных, находящихся в условиях длительного комбинированного стресса. И результаты свидетельствуют о разных способах регуляции у самцов и самок в период стресса [164-170].

Так уже у интактных самок уровень свободного  $T_4$  статистически значимо превосходит этот показатель у самцов, что обуславливает интересную закономерность: при тяжелом комбинированном стрессе компенсация у самцов происходит за счет поддержания уровня кортизола, и лишь в критической ситуации резкого его падения на 14 сутки, роль гормона мобилизации и адаптации берет на себя тироксин, а у самок наблюдается противоположная картина: истощение выработки кортизола в поддержании гомеостаза сопровождается нормальным уровнем тироксина и тенденцией к росту ТТГ. При этом как у самок, так и у самцов значимо увеличивается уровень кортикостерона, и у самцов его динамика более выражена. На наш взгляд, уровень  $T_4$  отражает не только функцию щитовидной железы, но и картину физиологической регуляции, обусловленной «запросом периферии», соответствующим уровнем гормонов-регуляторов, которыми являются рилизинг-факторы гипоталамуса, ТТГ и другие модулирующие гормоны, в частности эстрогены, влияющие на синтез гормона и

транспортных белков. Уровень Т4 указывает на сдвиги центральной регуляции функции щитовидной железы как звено метаболической цепи, регулирующейся по механизму обратной связи центра и периферии [171-174].

Изучение *иммуноморфологии ткани щитовидной железы* и выявление молекулярных маркеров «уязвимости» тироцитов наряду с другими стресс-индуцированными изменениями, позволило сформулировать гипотезу развития уже морфологических патогенетических изменений ткани железы при стрессе. А затем – спроецировать данную модель на человека и подтвердить гипотезу схожих процессов при возникновении пролиферативных и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы у людей. Это дало возможность получить принципиально новые фундаментальные данные, имеющие прикладное значение для оптимизации хирургической тактики в клинике.

На основании изложенного выше (что щитовидная железа становится доминирующей в регуляции адаптации у самок в период стресса), большой интерес вызывают *гендерные особенности* стрессовых реакций.

Половые отличия эффектов стрессорного воздействия выявлены в группе с обычным питанием уже в конце второй недели гиподинамии и сохранился на третьей неделе. У самок за счет лейкопении, лимфопении и гранулоцитоза индекс соотношения лимфоцитов к нейтрофилам л/н снизился до реакции активации, а у самцов остался в пределах нормы ( $p \leq 0,05$ ). В группе с алиментарным ограничением на фоне стресса более чувствительными оказались самцы. Уже в конце первой недели среднее абсолютное значение индекса в группе самцов соответствует реакции активации, что на 51,4% ( $p \leq 0,05$ ) ниже, чем у самок. Далее показатели индекса у животных обоих полов достигают значения реакции тренировки и стресс-реакции.

При исследовании показателей ЧСС, ЧДД и SpO<sub>2</sub>, установлено, что в группе самцов и самок под действием стресса зарегистрировано достоверное увеличение значений ЧСС; снижение значений ЧДД и SpO<sub>2</sub>, в группе с ограничением питания эти признаки более выражены у самок.



При изучении морфологии и индексов пролиферации и апоптоза тканей щитовидной железы на фоне стресса и /или ограничения питания, которому подверглись животные, также выявлена зависимость от пола. У контрольной группы уровень экспрессии Ki-67 в среднем составил 2,4% у самок и 4,25% у самцов, что возможно связано с разными темпами динамики их роста. При ограничении питания, картина меняется на противоположную – у самок эпителий активно пролиферирует, а у самцов – нет. Аналогично, с еще более выраженным расхождением показателей между самцами и самками, животные реагируют на иммобилизационный стресс. У стрессированных самок степень экспрессии Ki-67 равна 11,25%. У самцов, наоборот, это значение 1,5%. В группе животных с комбинацией стресса, содержащихся на дефицитной диете и иммобилизации, самки в ряде случаев не доживают до конца эксперимента.

Многофакторный анализ ANOVA показал высокую степень влияния (96,7%) пола животных на показатели пролиферации железистого эпителия.

С точки зрения пролиферативно-апоптотического дисбаланса очень негативны изменения рецепторов - маркеров апоптоза FAS-R на тироцитах: при ограничении питания экспрессия FAS-рецепторов у самок снизилась на 40% относительно контрольной группы, а у самцов показатели практически не изменились. Эта тенденция усугубляется с увеличением периода стресса и его комбинации с нарушением питания и, по-видимому, является ключевым фактором трансформации тироцитов и развития заболеваний. Прослеживается прямая связь между внешними стрессорами и развитием функциональных и органических компенсаторных изменений в щитовидной железе, что указывает на ведущую патогенетическую роль адаптационного синдрома в развитии патологии органа. Высокая чувствительность щитовидной железы к стрессу зависит от пола и проявляется функциональными и морфологическими изменениями в ее тканях.

*Помимо патогенетического объяснения происходящего в ткани железы, эти же маркеры являются диагностическими белками и дают возможность оценить серьезность и глубину повреждения железы при ИГХ и ИЦХ диагностике, а предложенный метод клеточный блоков позволяет также*

*призвать на помощь МГИ метод при потребности выявления соматических (спорадических) мутаций в тироцитах, усугубляющих патогенетические сдвиги в железе.*

И в этой диагностике ключевую роль играют апоптотические FAS-R.

Ряд исследований сообщили о том, что CD95 может быть использован в качестве положительных прогностических маркеров рака [17, 19, 107]. Было обнаружено снижение сывороточного FAS-R у онкологических больных, что по мнению авторов вероятно связано с блокадой экспрессии FAS-R стимуляторами опухолевого роста, которые защищают опухолевые клетки от развития в них процессов апоптоза, это приводит к блокаде апоптоза, следствием которой является бесконтрольная пролиферация опухолевых клеток [110, 111]. Таким образом, критерием отличия клеток нормальной ткани щитовидной железы от клеток опухоли может быть количество FAS-R на мембранах этих клеток. В наших исследованиях мы получили данные, подтверждающие данную гипотезу и интересный статистически значимый новый материал для внедрения в практику.

На этом этапе мы завершили поиск соответствующих молекулярно-диагностических маркеров.

Таким образом, имея большой опыт работы с пациентами такого профиля, прослеживая их в течение длительного времени, мы приступили к выработке алгоритма со следующими положениями: подвергаются ТАПБ все узлы, требующие как диагностики, так и наблюдения; пункция происходит из двух точек, минимум 4 стекла, материал окрашивается по Романовскому, его смотрит патолог, который прошел специализацию в цитологической оценке узлов щитовидной железы, верифицирующий свое цитологическое заключение на послеоперационном этапе, если первичной оценки недостаточно, необходима ИГХ на клеточном блоке.

Нам удалось внедрить этот алгоритм и показать его эффективность на большом количестве пациентов в ретроспективном исследовании.

Предоперационный этап диагностики узловых образований ЩЖ основан на мультидисциплинарном подходе с участием 1) терапевта, направляющего

пациента, 2) врача УЗИ и хирурга, выполняющих ТАПБ и 3) морфолога, оценивающего цитологию пунктата. Этот алгоритм стандартизирован в Национальном центре клинической морфологической диагностики (СПб) и внедрен нами в практику работы КММЦ Святителя Луки. Это очень важный этап, поскольку происходит принятие решения об объеме и радикальности операции. Однако в редких сложных случаях морфологу сложно оценить мазок («серая зона») или есть дополнительные признаки высоко злокачественного образования, тогда появляется необходимость в использовании методов МГД для принятия верного решения. Используемые методы МГД - это две методики, которые благодаря использованию клеточного блока (аналог гистологического образца из материала ТАПБ) можно делать на предоперационном этапе, а не только на операционном материале: 1) это ИГХ с определением предложенного нами индекса злокачественности; 2) поиск мутации BRAF в гене V-600E ПЦР-методом. Их положительные результаты влияют на выбор тактики!

Такой протокол мы отработали на протяжении 3,5 лет, из которых 2 года совпали с пандемией. В связи с чем мы приводим математические данные в разбивке на три периода – до, во время и после пандемии, учитывая и то, что постепенно шло совершенствование диагностики и увеличение потока пациентов, не снизившееся в период COVID-19, и эти периоды совпали с нашей работой.

Наша экспериментальная работа подтвердила гипотезу роли стресса и нарушения сигнального пути регуляции апоптоза в развитии патологии щитовидной железы. Наша клиническая работа показала перспективность исследования маркеров клеточного цикла для молекулярной диагностики и позволила улучшить эту работу, что подтвердил ретроспективный анализ на протяжении 3,5 лет. Наш ретроспективный анализ и данные мировой статистики также показали изменение заболеваемости патологией щитовидной железы в стрессовых условиях у человека, что подтверждает нашу гипотезу и делает работу актуальной и нужной.

## ВЫВОДЫ

1. Иммуобилизационный стресс вызывает у крыс реакцию повышенной активации на 14-21 сутки, сопровождающуюся увеличением ЧСС на 8,0-10,3%, снижением ЧДД и SpO<sub>2</sub> на 22,4-23,1% и 10,2-13,3%, соответственно; снижением уровня кортизола в крови в 1,7-5,7 раз и ростом уровня кортикостерона в 2,6-2,9 раз. Комбинированный стресс к 21 дню вызывает стресс-реакцию с более выраженными изменениями ЧСС и ЧДД, снижением SpO<sub>2</sub> до 30,0%, схожей динамикой кортизола и кортикостерона и сохранением выработки T<sub>4</sub> на уровне контрольных цифр, при этом у самцов уровень ТТГ снижается в 2,0-6,0 раз, а у самок имеет тенденцию к росту.

2. Монофакторный стресс задерживает дифференцировку ткани щитовидной железы крыс, изменяет индекс пролиферации тироцитов: на 7 сутки он растет у самок (от 2,4% до 11,3%) и не меняется у самцов, а к 21-м суткам снижается до 1,3-1,5%, что сопровождается прогрессивным ростом экспрессии маркера апоптоза. Комбинированный стресс вызывает неравномерную дифференцировку щитовидной железы: среди участков незрелой ткани образуются гипертрофические фолликулы, на фоне прогрессивного роста экспрессии FAS-R; у самок объем железы увеличивается на 30,2%.

3. У человека при папиллярной карциноме, токсическом зобе, АИТ и аденоматозном зобе на материале ТАПБ выявлена также разнонаправленная экспрессия маркеров митоза и апоптоза. Кластерный анализ выделил группу пациентов (со значениями 2,3-9,0 для FAS, 0,9-4,1 для Ki-67) с верифицированной папиллярной карциномой и группу – с коллоидным узлом. Предложен расчет Z-индекса, отражающего злокачественный потенциал ткани по формуле  $Z = \frac{FAS-R}{(Ki67+1)}$ , являющегося дополнительным критерием в сомнительных диагностических случаях.

4. Разработан и апробирован алгоритм комплексной предоперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узловых

образований щитовидной железы, который включает выполнение ТАПБ узлов под контролем УЗИ, приготовление цитологического препарата, изготовление клеточного блока и исследование экспрессии Ki-67 и FAS-R, вычисление индекса злокачественности, МГИ на наличие мутации V600E гена BRAF.

5. Ретроспективный анализ использования предложенного алгоритма за период 3,5 лет (с января 2019 по июль 2022 года) показал рост процента узловых образований, требующих оперативного вмешательства, с подозрением на атипию или с достоверными признаками рака (III-VI категории по Bethesda) от 8,8% до 16,6%, рост частоты встречаемости папиллярного рака на 10,3% и выявление ЗНО на более ранних стадиях опухолевого роста.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рассчитан Z-индекс, отражающий злокачественный потенциал узловых образований щитовидной железы по формуле:  $Z = FAS-R / (Ki67 + 1)$ , где FAS-R и Ki-67 – среднее количество иммунопозитивных клеток по 10 полям зрения в препарате. При величине Z-индекса менее 1,1 и отсутствии мутации V600E гена BRAF судят о низком риске злокачественного роста и рекомендуют динамическое наблюдение, при величине Z-индекса более 2,8 или (и) наличии мутации делают заключение о высоком риске, при величине индекса 1,1-2,8 судят о среднем риске и рекомендуют повторную ТАПБ.

2. Предложено из материала ТАПБ готовить мазок и клеточный блок для выполнения ИГХ и МГИ (при показаниях). Это вносит вклад в решение проблемы выбора хирургической тактики, ориентируясь на данные традиционной ТАПБ узлов щитовидной железы с применением молекулярных методик.

3. Знание ведущей роли стресса, как инициирующего фактора в развитии тиреоидной патологии, данные о половом диморфизме и функциональных особенностях щитовидной железы, обуславливающих различия заболеваемости у мужчин и женщин, могут служить основой для дальнейшего изучения, разработки и внедрения в клиническую практику методов профилактики и комплексной терапии патологии щитовидной железы с точки зрения ограничения стрессового воздействия.

**ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

АИТ – аутоиммунный тиреоидит

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественное новообразование

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЦХ – иммуноцитохимия

МГИ – молекулярно-генетическое исследование

МКБ – международная классификация болезней

SpO<sub>2</sub> – сатурация

ТАПБ – тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия

ТПО – тиреопероксидаза

ТТГ – тиреотропный гормон

T<sub>3</sub> – трийодтиронин

T<sub>4</sub> – тетраiodтиронин

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦНИЛ – Центральная научно-исследовательская лаборатория

ЧДД – частота дыхательных движений

ЧСС – частота сердечных сокращений

M – средняя величина значений

m – ошибка средней величины

p – достоверность статистического показателя

sd – среднеквадратическое отклонение

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инновационные технологии в диагностике и безопасном хирургическом лечении заболеваний щитовидной железы / П.Н. Ромащенко, Н.А. Майстренко, Д.С. Криволапов, М.С. Симонова // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2022. – Т. 24. № 1. – С. 9-15.
2. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide / F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, I. Soerjomataram // Cancer. – 2021. – Vol. 127(16). – P. 3029–3030.
3. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020 : Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. – WHO, 2020. Accessed December 11, 2020. – [who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-1](http://who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-1).
4. Thyroid function in critically ill patients / E. Fliers, A. C. Bianco, L. Langouche, A. Boelen // Lancet Diabetes Endocrinol. – 2015. – Vol. 3(10). – P. 816–825.
5. United Nations Development Programme (UNDP). Human Development Report 2019. Beyond Income, Beyond Averages, Beyond Today: Inequalities in Human Development in the 21st Century. – UNDP, 2019. Accessed November 25, 2020. – [hdr.undp.org/en/content/human-development-report-2019](http://hdr.undp.org/en/content/human-development-report-2019)
6. Ромащенко, П. Н. Молекулярно-генетические исследования в хирургии щитовидной железы / П.Н. Ромащенко, Н.А. Майстренко, Д.С. Криволапов, М.С. Симонова // Таврический медико-биологический вестник. – 2021. – Т. 24. № 2. – С. 118-126.
7. Заболевания щитовидной железы и риск возникновения нетиреоидной патологии / Р.И. Глушаков, Е.В. Козырко, И.В. Соболев, С.А. Ермолова, О.В. Власьева, А.А. Кузин, Н.И. Тапильская // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98. № 1. – С. 77-84.



8. Omran, A. R. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change / A. R. Omran // *Milbank Mem Fund Q.* – 1971. – Vol. 49. – P. 509–538.
9. Asif, F. Identification of the risk factors of the thyroid cancer by using logit model in Lahore / F. Asif, M. Noor-Ul-Amin, M. R. Ahmad // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science.* – 2018. – Vol. 31, N 6. – P. 2391–2396.
10. Безруков, О. Ф. Операции на щитовидной железе. Задачи и нерешенные проблемы / О. Ф. Безруков // *Вестник хирургии имени И. И. Грекова.* – 2015. – N 1. – С. 73–74.
11. Gersten, O. The cancer transition in Japan since 1951 / O. Gersten, J. R. Wilmoth // *Demogr Res.* – 2002. – Vol. 7. – P. 271–306.
12. Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – Vol. 71, N 3. – P. 209–249.
13. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с.
14. Безруков, О. Ф. Узловой зоб в крымском регионе: этиологические проблемы и перспективы диагностики / О. Ф. Безруков // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* – 2011. – N 3–4. – С. 171–178.
15. Fas/CD95 prevents autoimmunity independently of lipid raft localization and efficient apoptosis induction / A. C. Cruz, M. Ramaswamy, C. Ouyang [et al.] // *Nature Communications.* – 2016. – Vol. 23(7). – P. 13895.
16. Krishna, V. N. Association between bipolar affective disorder and thyroid dysfunction / V. N. Krishna // *Asian Journal of Psychiatry.* – 2013. – Vol. 6(1). – P. 42–45.
17. Role of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat thyroid toxicity caused by excess fluoride and/or iodide / H. Liu, C. Hou, Q. Zeng [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* – 2016. – Vol. 46. – P. 277–285.

18. Uribe, R. M. Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats / R. M. Uribe, L. Jaimes-Hoy, C. Ramírez-Martínez // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155(5). – P. 2020–30.
19. Role of levothyroxine and vitamin E supplementation in the treatment of oxidative stress-induced injury and apoptosis of myocardial cells in hypothyroid rats / J. Ye, X. Zhong, Y. Du [ et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. – 2017. – Vol. 40(7). – P. 713–719.
20. Thyroid Dysfunction, Neurological Disorder and Immunosuppression as the Consequences of Long-term Combined Stress / J. Zhang, J. Huang, K. Aximujiang [ et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8(1). – P. 4552.
21. Бильжанова, Г. Ж. Морфофункциональный профиль щитовидной железы самцов крыс wistar в рамках экспериментальной модели "гипотиреоз - стресс" / Г. Ж. Бильжанова, И. В. Чекуров, Т. Я. Вишневская // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2016. – N 2(58). – С. 177–180.
22. Геворкян, В. С. Современные исследования воздействия различных стресс-факторов на крыс и мышей / В. С. Геворкян, И. С. Геворкяна // *Альманах Пространство и Время*. – 2017. – Т.15, N 1. – С. 9.
23. Коршунова, Д. В. Влияние хронического психосоциального стресса на интенсивность дегенеративных изменений в сетчатке у крыс с различной стресс-резистентностью / Д. В. Коршунова, Е. А. Гиззатуллина, И. Г. Брындина // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки*. – 2014. – Т. 16, N 5–4. – С. 1215–1218.
24. Надольник, Л. И. Стресс и щитовидная железа / Л. И. Надольник // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56, N 4. – С. 443–456.
25. Стяжкина, С. Н. Частота встречаемости рака щитовидной железы на фоне других тиреодных патологий у женщин / С. Н. Стяжкина, Е. Т. Колесникова, А. Н. Люкина // *Синергия Наук*. – 2018. – Т. 22. – С. 1287–1289.

26. Ясенявская, А. Л. Влияние антиоксидантов на морфометрические показатели щитовидной железы разновозрастных крыс в условиях иммобилизационного стресса / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, С. А. Лужнова // Биомедицина. – 2014. – N 3. – С. 78–82.

27. A possible role for selenoprotein glutathione peroxidase (GPx1) and thioredoxin reductases (TrxR1) in thyroid cancer: our experience in thyroid surgery / A. Metere, F. Frezzotti, C. E. Graves [et al.] // Cancer Cell Int. – 2018. – Vol. 18, N 7. – <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0504-4>

28. Воробьев, С. Л. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы (цитология для патологов, патология для цитологов) : атлас / С. Л. Воробьев. – Санкт-Петербург : «Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2014. – 104 с.

29. Cibas, E. S. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology / E. S. Cibas, S. Z. Ali // Am J Clin Pathol. – 2009. – Vol. 132(5). – P. 658–65.

30. Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules / J. Feldkamp, D. Führer, M. Luster [ et al.] // Dtsch Arztebl Int. – 2016. – Vol. 113(20). – P. 353–359.

31. Габаидзе, Д. И. Спорные вопросы в диагностике и хирургическом лечении пациентов с «фолликулярной неоплазией» щитовидной железы / Д. И. Габаидзе, Л. И. Ипполитов // Head and neck/голова и шея. – 2019. – N 2. – С. 70–74.

32. Михайлова, М. В. Диагностическая и лечебная тактика при "фолликулярной опухоли" щитовидной железы / М. В. Михайлова, И. Н. Зубаровский, С. К. Осипенко // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2015. – N 2. – С. 77–80.

33. Клинико-морфологическая и иммуногистохимическая характеристика фолликулярных опухолей щитовидной железы / Н. Ю. Орлинская, Н. М. Хмельницкая, А. А. Федоров, Е. Л. Бедерина // Медицинский альманах. – 2015. – N 2(37). – С. 135–138.

34. Мутация BRAF V600E при папиллярном раке щитовидной железы, клиничко-морфологические параллели и прогноз / А. А. Иванов, А. М. Авдалян, В. Я. Гервальд [и др. ] // Российский онкологический журнал. –2017. – Т. 22, N 1. – С. 15–20.
35. Vargas-Pinto, S. Lobectomy Compared to Total Thyroidectomy for Low-Risk Papillary Thyroid Cancer: A Systematic Review / S. Vargas-Pinto, A. Minerva, R. Arenas // Journal of Surgical Research. – 2019. – Vol. 242. – P. 244–251.
36. Ahmed, S. A. 1870P - Thyroid lobectomy versus total thyroidectomy among early-stage papillary thyroid carcinoma patient / S. A. Ahmed, M. A. Basha, S. M. Elshafie // Annals of Oncology. – 2019. – Vol. 30. – P. 758.
37. Rebecca D Chernock. Immunohistochemistry of thyroid gland carcinomas: clinical utility and diagnostic pitfalls / Rebecca D Chernock // Diagnostic Histopathology. – 2016. – Vol. 22(5). – P. 184–190.
38. Возможности иммуногистохимического исследования для оценки пролиферативной активности ткани щитовидной железы / С. Н. Стяжкина, Е. Л. Порываева, М. Н. Климентов, А. В. Леднева // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – N 2. – С. 21.
39. Калмин, О. В. Иммуногистохимическое исследование фолликулярных опухолей щитовидной железы / О. В. Калмин, И. И. Чаиркин, О. О. Калмин // Известия высших учебных заведений. – 2017. – N 1(41). – С. 28–38.
40. The stress-activated protein kinase pathway and the ex-pression of stanniocalcin-1 are regulated by miR-146b-5p in papillary thyroid carcinogenesis / Abeer Al-Abdallah, Iman Jahanbani, Heba Mehdawi [ et al.] // Cancer Biol Ther. – 2020. – Vol. 21(5). – P. 412–423.
41. Miller, G. E. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans / G. E. Miller, E. Chen, E. S. Zhou // Psychol Bull. – 2007. – Vol. 133(1). – P. 25–45.
42. Pompella, A. Review Agents and Mechanisms of Oxidative Stress in Human Pathology / A. Pompella // The New Armenian Medical Journal. – 2013. –Vol. 7(2). – P. 4–14.

43. Грязнова, М. А. Особенности цитокиновой регуляции при аутоиммунной патологии щитовидной железы (обзор) / М. А. Грязнова, Л. Ю. Хамнуева // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, N 7. – С. 33–42.
44. Ясенявская, А. Л. Изучение влияния иммобилизационного стресса и антиоксидантов на гормональную активность щитовидной железы белых крыс на разных этапах онтогенеза / А. Л. Ясенявская // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2010. – N 2. – С. 689–693.
45. Погосян, В. А. Исследование поведения крыс в условиях гипокинезии и под влиянием пирацетама / В. А. Погосян // Медицинская наука Армении. НАН РА. – 2010. – N 4. – С. 50–55.
46. Залесский, В. Н. Роль фактического питания при дисрегуляции воспалительного ответа на стресс, депрессию и нарушение настроения / В. Н. Залесский // Проблемы питания. – 2012. – N 1 (2). – С. 10–18.
47. Морфология стресс-ассоциированных изменений фолликулярного компартмента щитовидной железы при действии жесткого стрессора / Т. С. Смирнова, Ю. В. Дегтярь, Н. И. Кокин [и др. ] // Вестник Вол ГМУ. – 2009. – Вып. 2. – С. 82–95.
48. Цымбал, А. А. Влияние длительного стресса и терагерцевого излучения на частотах оксида азота на функциональную активность щитовидной железы / А. А. Цымбал, В. Ф. Киричук, М. О. Куртукова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6, N 4. – С. 767–771.
49. Гаркави, Л. Х. Адаптационные реакции и резистентность организма / Л. Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, М. А. Уколова. – Ростов- на- Дону : Изд-во Ростов. гос. ун-та, 1990. – 223 с.
50. Гаркави, Л. Х. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации / Л. Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, Т. С. Кузьменко. – Москва : Имедис, 1998. – 656 с.
51. Пшенникова, М. Г. Врожденная эффективность стресслимитирующих систем, как фактор устойчивости к стрессорным повреждениям / М. Г. Пшенникова // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, N 3. – С. 55–67.

52. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных : справочник. – Санкт-Петербург : ЛЕМА, 2013. – 116 с.
53. Физиология животных и этология / В. Г. Скопичев, Т. А. Эйсымонт, Н. П. Алексеев [и др.]. – Москва : КолосС, 2005. – 720 с.
54. Гордиенко, В. М. Ультраструктура желез эндокринной системы / В. М. Гордиенко, В. Г. Козырицкий. – Киев : Здоровье, 1978. – 288 с.
55. DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women / A. K. Lennartsson, M. M. Kushnir, J. Bergquist, I. H. Jonsdottir // *Biol Psychol.* – 2012. – Vol. 90(2). – P. 143–9.
56. Дмитриева, Т. Б. Половые и гендерные аспекты стрессоустойчивости (аналитический обзор). Часть 1 / Т. Б. Дмитриева, А. З. Дроздов // *Российский психиатрический журнал.* – 2010. – N 1. – С. 18–24.
57. Josef Köhrle. Selenium and thyroid, *Best Practice & Research* / Josef Köhrle, Roland Gärtner // *Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2009. – Vol. 23, N 6. – P. 815–827.
58. Alvin Taurog. Molecular evolution of thyroid peroxidase\*\*Adapted from Taurog A., Wall M., *Thyroid* 8 (1998) 185–191, with permission from the publisher, Mary Ann Liebert, Inc. / Alvin Taurog // *Biochimie.* – 1999. – Vol, 81, N 5. – P. 557–562.
59. Nuclear Redox Signaling / Margarete Lukosz, Sascha Jakob, Nicole Büchner [ et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling* – 2010. – Vol. 12, N 6. – P. 713–742.
60. When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2 / Aurore Carré, Ruy A.N. Louzada, Rodrigo S. Fortunato [ et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2015. –Vol. 23, N 9. – P. 724–733.
61. A Redundant Role of Human Thyroid Peroxidase Propeptide for Cellular, Enzymatic, and Immunological Activity / Marlena Godlewska, Monika Góra, Ashley M. Buckle [ et al.] // *Thyroid.* – 2014. – Vol. 24, N 2. – P. 371–382.

62. Conformation of the N-Terminal Ectodomain Elicits Different Effects on DUOX Function: A Potential Impact on Congenital Hypothyroidism Caused by a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production Defect Ruy / Andrade Louzada, Raphael Corre, Rabii Ameziane-El-Hassani // *Thyroid*. – 2018. – Vol. 28, N 8. – P. 1052–1062.

63. Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease / Y. Song, N. Driessens, M. Costa [ et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2007. – Vol. 92, N 10. – P. 3764–3773.

64. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases / Ildiko Szanto, Marc Pusztaszeri Maria Mavromati // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8(5). – P. 126.

65. The Spectrum of Thyroid Function Tests During Hospitalization for SARS COV-2 Infection / I. Campi, I. Bulgarelli, A. Dubini [et al.] // *Eur J Endocrinol*. – 2021. – Vol. 184(5). – P. 699–709.

66. Impact of the COVID-19 pandemic on surgery for thyroid cancer in Italy: nationwide retrospective study / F. Medas, G. L. Ansaldo, N. Avenia [ et al.] // *British Journal of Surgery*. – 2021. – Vol. 108, N 4. – P. e166–e167.

67. Immediate and long-term impact of the COVID-19 pandemic on delivery of surgical services / K. Søreide, J. Hallet, J. B. Matthews [et al.] // *Br J Surg*. – 2020. – Vol. 107. – P. 1250–126.

68. Cleavage Region Thyro-tropin Receptor Antibodies Influence / Syed A Morshed, Risheng Ma, Rauf Latif, Terry F Davies // *Thyroid Cell Survival*. – 2019. – Vol. 29, N7. – P. 993–1002.

69. A Pathological Report of Three COVID-19 Cases by Minimal Invasive Autopsies / X. H. Yao, T. Y. Li, Z. C. He [ et al.] // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. – 2020. – Vol. 49(5). – P. 411–7.

70. Уровень ТТГ у больных COVID-19 средней и тяжёлой степени тяжести в остром периоде заболевания / А. А. Михайлова, Д. И. Лагутина, К. А. Головатюк [и др.] // *Медицинский вестник Юга России*. – 2022. – Т. 13, N 1. – С. 72–79.

71. COVID-19 endocrinopathy with hindsight from SARS / N. Kothandaraman, A. Rengaraj, B. Xue [ et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2021. – Vol. 320(1). – P. E139–E150.
72. Disease Following SARS-CoV-2 Vaccination: A Systematic Review / A. Patrizio, S. M. Ferrari, G. Elia [ et al.] // *Vaccines (Basel).* – 2022. – Vol. 10(9) – P. 1445.
73. Vojdani, A. Reaction of Human Monoclonal Antibodies to SARS-CoV-2 Proteins with Tissue Antigens: Implications for Autoimmune Diseases / A. Vojdani, E. Vojdani, D. Kharrazian // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 3679.
74. Kanduc, D. Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: Implications for the vaccine / D. Kanduc, Y. Shoenfeld // *Immunol. Res.* – 2020. – Vol. 68. – P. 310–313.
75. Lanzolla, G. Graves' disease and Graves' orbitopathy following COVID-19 / G. Lanzolla, C. Marcocci, M. Marinò // *J Endocrinol Invest.* – 2021. – Vol. 44(9). – P. 2011–2012.
76. Inaba, H. Coronavirus Disease 2019 and the Thyroid - Progress and Perspectives / H. Inaba, T. Aizawa // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – Vol. 24, N 12. – P. 708333.
77. Хмельницкая, Н. М. Комплексная клинико-морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы / Н. М. Хмельницкая, Н. Ю. Орлинская. – Санкт-Петербург; Нижний Новгород : ООО «Ремедиум Приволжье», 2014. – 180 с.
78. Хмельницкий, О. К. Гистологическая диагностика опухолей щитовидной железы : пособие для врачей / О. К. Хмельницкий. – Санкт-Петербург : ООО «Абрис», 2000. – 40 с.
79. Лабораторная диагностика опухолевых заболеваний щитовидной железы / А. Ю. Абросимов, Ф. М. Абдулхабирова, Л. В. Никанкина, Е. А. Трошина // *Consilium Medicum.* – 2019. – Т. 21, N 12. – С. 31–47.
80. Гельцер, Б. И. Эволюция взглядов на патогенез аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и перспективы их таргетной терапии / Б. И.



Гельцер, В. В. Здор, В. Н. Котельников // Клиническая медицина. – 2017. – N 6. – С. 524–534.

81. Рак щитовидной железы и методы его иммуногистохимической диагностики / В. Я. Гервальд, В. В. Климачев, А. М. Авдалян [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – N 10 (часть 10). – С. 1911–1917.

82. Эндокринная хирургия / ред. И. И. Дедов, Н. С. Кузнецов, Г. А. Мельниченко. – Москва : Литтера, 2014. – 344 с.

83. Эндокринология : национальное руководство / под ред. И. И. Дедова, Г. А. Мельниченко. – 2-е изд. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 1112 с.

84. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / В. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible [et al.] // Thyroid. – 2016. – Vol. 26(1). – P. 1–133.

85. Классификация Бетесда для цитологической диагностики заболеваний щитовидной железы : терминология, критерии и пояснения / Под ред. С. Али, Э. Сибаса; пер. с англ.; Под науч. ред. проф. Н.А. Шапиро. – Москва : Практическая медицина, 2020. – 240 с.

86. <https://www.thyroid.org/professionals/calculators/thyroid-cancer-staging-calculator/> электронный ресурс – онлайн-калькулятор для определения уровня риска рецидива.

87. Патент № 2727742. Российская Федерация, МПК G01N 21/00, A61B 5/026, A61B 10/02. Способ пункционной биопсии объемных образований щитовидной железы : № 2018145376 : заявл. 19.12.2018 : опубл. 23.07.2020/ Сигал З. М.

88. Патент № 2713945. Российская Федерация, МПК A61B 8/08. Способ прогнозирования вероятности рака щитовидной железы на основе соноэластографии : №2019137258 : заявл. 19.11.2019 : опубл. 11.02.2020 / Тимофеева Л. А.

89. Патент № 2386398. Российская Федерация, МПК А61В 8/13. Способ дифференциальной диагностики опухолей щитовидной железы : № 2008143093/14 : заявл. 31.10.2008 : опубл. 20.04.2010 / Видюков В. И., Перфильева О. М.

90. Патент № 2247376. Российская Федерация, МПК G01N 33/48, А61В 10/00. Способ экспресс-диагностики структурных изменений в щитовидной железе человека : №2003119393/14 : заявл. 25.06.2003 : опубл. 27.02.2005 / Савина Л. В. Чекмарева С. Е.

91. Патент № 2726601. Российская Федерация, МПК А61В 6/03. Способ диагностики хирургических заболеваний щитовидной железы с использованием динамической двухиндикаторной сцинтиграфии : № 2019139704 : заявл. 04.12.2019 : опубл. 14.07.2020 / Ромащенко П. Н., Майстренко Н. А., Бойков И. В. [и др.]

92. Патент № 2646800. Российская Федерация, МПК G01N 33/573. Способ дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы : № 2016108254 : заявл.09.03.2016 : опубл.14.09.2017 / Шахбанов Р. К., Дибиров Т. М., Бакуев М. М. [и др.]

93. Патент № 2521239. Российская Федерация, МПК G01N 33/52. Способ интраоперационной диагностики рака щитовидной железы : № 2013108352/15 : заявл.26.02.13 : опубл.27.06.2014 / Астахова Т. М., Шарова Н. П., Сумеди И. Р. [и др.]

94. Патент № 2299687. Российская Федерация, МПК А61В 8/06 А61В 5/026. Способ интраоперационной дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы : № 2005137967/14 : заявл.06.12.2015. : опубл.27.05.2007/ Резанцева Н. П., Жерлов Г. К., Карпович А. В. [и др.]

95. Патент № 2624377. Российская Федерация, МПК А61В 10/02, А61В 5/00, G01N 33/483. Способ интраоперационной дифференциальной диагностики объемных образований щитовидной железы : № 2016115801 : заявл. 22.04.2016 : опубл. 03.07.2017 / Долидзе Д. Д., Мельник И. В.

96. Патент № 2332 172. Российская Федерация, МПК А61В 10/00 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01) Способ дифференциальной диагностики атипической фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы : №2007102741/14 : заявл. 24.01.2007 : опубл. 27.08.2008 / Шкурупий В. А., Полоз Т. Л., Полоз В. В.

97. Патент № 2253369. Российская Федерация, МПК А61В 8/00 . Способ дифференциальной диагностики токсической аденомы и диффузного токсического зоба с узлами : №2004102170/14 : заявл. 26.01.2004 : опубл. 10.06.2005 / Гаспарян Э. Г., Горошко О. А.

98. Патент № 2300106. Российская Федерация, МПК G01N 33/53. Способ дифференциальной диагностики злокачественных опухолей щитовидной железы у детей и подростков : №2005132143/15 : заявл.17.10.2005 : опубл. 27.05.2007 / Сидоренко Ю. С., Козель Ю. Ю., Кузнецов С. А.

99. Патент № 2267997. Российская Федерация, МПК А61В 10/00, G01N33/48. Способ дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы : № 2003122940/15 : заявл. 21.07.2003 : опубл. 27.01.2005 / Зубеев П. С., Потехина Ю. П., Коновалов В. А.

100. Патент № 2712080. Российская Федерация, МПК А61В 10/04, G01N 33/48. Способ проведения цитологического исследования при дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы : № 2019114418 : заявл.14.05.2019 : опубл.24.01.2020 / Рева И. В., Рева Г. В., Калинин И. О. [и др.]

101. Патент № 2293524. Российская Федерация, МПК А 61В 10/00, G01N 33/48. Способ дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы : №2005112953/14 : заявл. 28.04.2005 : опубл. 20.02.2007/ Полоз Т. Л., Демин А. В., Шкурупий В. А.

102. Chernock, R. D. Immunohistochemistry of thyroid gland carcinomas: clinical utility and diagnostic pitfalls / R. D. Chernock // Diagnostic Histopathology. – 2016. – Vol. 22(5). – P. 184–190.

103. Improvement of the cytological diagnostic accuracy of follicular thyroid lesions by the use of the Ki-67 proliferative index in addition to cytokeratin-19 and

HBME-1 immunomarkers: a study of 61 cases of liquid-based FNA cytology with histological controls / L. Lacoste-Collin, D. d'Aure, E. Bérard [ et al.] // *Cytopathology*. – 2014. – Vol. 25, N 3. – P. 160–9.

104. Хоперия, В. Г. Иммуноцитохимическое (hbme-1, ТПО) и цитохимическое (ДАП IV) исследование после ТАПБ узлов щитовидной железы / В. Г. Хоперия // *Клиническая эндокринология и эндокринная хирургия*. – 2010. – N 1(30). – С. 21–26.

105. Anna, U. Newlaczyla Lu-Gang Yub Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer / U. Anna // *Cancer Letters*. – 2011. –Vol. 313, N 2. – P. 123–128.

106. Differential protein expression profiles of cyst fluid from papillary thyroid carcinoma and benign thyroid lesions / A. Dinets, M. Pernemalm, H. Kjellin [ et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10(5). – P. e0126472.

107. Resistance to Fas-Mediated Apoptosis Does Not Correlate to Structural Alterations or Expression Changes of the Death Receptor in Papillary Thyroid Carcinomas / Fanourakis Angelica A Saetta, Andreas C. Lazaris , Maria Miaou-li [ et al.] // *Pathobiology*. – 2018. – Vol. 85(5–6). – P. 304–310.

108. A comparative study of nuclear 8-hydroxyguanosine expression in Autoimmune Thyroid Diseases and Papillary Thyroid Carcinoma and its relationship with p53, Bcl-2 and Ki-67 cancer related proteins / Malek Mseddi, Riadh Ben Mansour, Naourez Goui-ia [ et al.] // *Adv Med Sci*. – 2017. – Vol. 62(1). – P. 45–51.

109. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer / M. E. Peter, A. Hadji, A. E. Murmann [ et al.] // *Cell Death Differ*. – 2015. –Vol. 22 N 5. – С. 885–886.

110. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis / M. O. Hengartner // *Nature*. – 2000. – Vol. 407(6805). – P. 770–6.

111. Chwiłkowska, A. Śmierć komórek nowotworowych. Udział reakcji fotodynamicznej w indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych [Death of tumor cells. Photodynamic reaction in apoptosis induction in cancer cells] / A. Chwiłkowska, J. Kulbacka, J. Saczko // *Pol Merkur Lekarski*. – 2011. – Vol. 30(175). – P. 45–8.

112. Maternal predator odour exposure programs metabolic responses in adult offspring / Sophie St-Cyr, Sameera Abuaish, Kenneth C Welch Jr, Patrick O McGowan // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 24, 8(1). – P. 8077.

113. Surget, S. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective / S. Surget, M. Khoury, J. Bourdon // *Onco-Targets and Ther.* – 2014. – Vol. 7. – P. 57–68.

114. Группа компаний «БиоХимМак» Маркеры апоптоза : Электронный информационный ресурс. – [http://www.rusmedserv.com/files/labdiag/42\\_Apoptoz.pdf](http://www.rusmedserv.com/files/labdiag/42_Apoptoz.pdf)

115. Роль апоптоза в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы / Ю. В. Недосекова, О. И. Уразова, Е. Б. Кравец, А. В. Чайковский // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2009. – N 1. – С. 64–72.

116. Никифоров, П. В. Изучение роли каспаз, как возможного маркера при злокачественных новообразованиях / П. В. Никифоров, С. Н. Алексеева. – <http://www.scienceforum.ru/2014/584/1341>

117. Иммуноферментный анализ Fas- рецептора (CD 95) у лиц с патологией щитовидной железы / Н. В. Пивень, В. В. Новиков, Л. Н. Лухверчик, Е. И. Кузменкова // *Иммунология, аллергология, инфектология.* – 2001. – N 3. – С.15–20.

118. Clinical implications of the BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis / Woon Won Kim, Tae Kwun Ha, Sung Kwon Bae // *Comparative Study. J Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2018. – Vol. 47(1). – P. 4.

119. BRAF V600E mutation is associated with aggressive features in papillary thyroid carcinomas  $\leq 1,5$  cm / Jennifer A. Silver, Mariya Bogatchenko, Marc Pusztaszeri [ et al.] // *J Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2021. – Vol. 50(1). – P. 63.

120. Патент № 2705110. Российская Федерация, МПК C12Q 1/6851, C12Q 1/686, A61B 8/08. Способ диагностики эндотелиальной дисфункции по типам реагирования микрососудистого эндотелия : № 2019110794 : заявл. 10.04.2019 : опубл. 06.11.2019 / Дурлештер В. М., Катанян Г. А., Титов С. Е.

121. Патент № 2725749. Российская Федерация, МПК А61В 10/00, А61В 8/08, G01N 33/48. Способ оценки риска наличия рака щитовидной железы у пациента с узловыми образованиями щитовидной железы : № 2019137712 : заявл. 22.11.2019 : опубл. 03.07.2020 / Новосад С. В., Минушкина Л. О., Петунина Н. А., Мартиросян Н. С.

122. Роль молекулярно-генетических методов исследования в дооперационной диагностике узловых образований щитовидной железы / П. Н. Ромащенко, М. С. Симонова, Н. А. Майстренко, Д. С. Криволапов, Д. О. Вшивцев // В сборнике Современные образовательные технологии и актуальные модели распространения научной информации. - Издательство: ИП Барышов Д.А., Казань. – 2022. – С.14-17.

123. miRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors / S. E. Titov, M. K. Ivanov, E. V. Karpinskaya [ et al.] // BMC Cancer. – 2016. – Vol. 9, N16. – P. 201.

124. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25(4). – P. 402.

125. Combined quantitation of HMGA2 mRNA, microRNAs, and mitochondrial-DNA content enables the identification and typing of thyroid tumors in fine-needle aspiration smears / S. E. Titov, M. K. Ivanov, P. S. Demenkov [ et al.] // BMC Cancer. – 2019. –Vol. 9(1). – P. 1010.

126. Патент № 2332172. Российская Федерация, МПК А61В 10/00 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01). Способ дифференциальной диагностики атипичической фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы : №2007102751/14 : заявл. 24.01.2007: опубл. 27.08.2008 / Шкурупий В. А., Полоз Т. Л., Полоз В. В.

127. Патент № 2614700. Российская Федерация, МПК G01N 33/50. Способ дооперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы : №2016107032 : заявл.

26.02.2016 : опубл. 28.03.2017 / Саприна Т. В., Березкина И. С., Исаева А. В. [и др.]

128. Патент № 2229262. Российская Федерация, МПК А61В 5/02. Способ диагностики злокачественных опухолей щитовидной железы : №2003107531/14 : заявл. 19.03.2003 : опубл. 27.05.2004 / Вараксин В. В.

129. Патент № 2688189. Российская Федерация, МПК G01N 33/58, C12Q 1/6827. Панель последовательностей олигонуклеотидов для определения мутации Q61R гена NRAS в опухолевых образованиях щитовидной железы : № 2018144732 : заявл. 20.02.2019 : опубл. 21.05.2019 / Кочергина-Никитская И. Н., Владимирова У. С., Румянцев П. О.

130. Патент № 2757347. Российская Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6806 (2018.01) G01N 33/582 (2021.05) G01N 33/57438 (2021.08) C12Q 1/6806 (2021.05) C12Q 1/686 (2021.05) Способ дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы человека : №2021102961 : заявл. 08.02.2021 : опубл. 13.10.2021 / Титов С. Е., Веряскина Ю. А.

131. Бессалова, Е. Ю. Анатомия щитовидных желез белых крыс в норме и при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости / Е. Ю. Бессалова // Патология. – 2011. – Т. 8, N 3. – С. 100–103.

132. Забродин, В. А. Сравнительно-морфологическое исследование щитовидной железы млекопитающих животных и человека / В. А. Забродин, Е. С. Толстенкова, О. А. Васильева // Морфология. – 2011. – Т. 140, N 4. – С. 27–31.

133. Хмельницкий, О. К. Щитовидная железа как объект морфометрического исследования / О. К. Хмельницкий, М. С. Третьякова // Архив патологии. – 1998. – Т. 60, N 4. – С. 44–46.

134. Experimentation with animal models in space / В. Cohen, S. Yakushin, D. Tomko [et al.] // Biol. Med. – 2005. – Vol. 10. – P. 122–182.

135. Клетки крови и костного мозга : атлас / под ред. Г. И. Козинца. – Москва : Мед. информ. агентство, 2004. – 203 с.

136. Комаров, Ф. И. Хронобиология и хрономедицина / Ф. И. Комаров, С. И. Рапопорт. – Москва : Триада – Х, 2000. – 488 с.
137. Мальцев, Э. В. Методология научного творчества в медицине. Практические аспекты : монография / Э. В. Мальцев. – Одесса : Астропринт, 2006. – 120 с.
138. Добровольский, Г. А. Планирование медико-морфологического эксперимента / Г. А. Добровольский. – Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 1984. – 128 с.
139. Бессалова, Е. Ю. Анатомия щитовидных желез белых крыс в норме и при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости / Е. Ю. Бессалова // Патология. – 2011. – Т. 8, N 3. – С. 100–103.
140. Каширина, Н. К. Методика выделения и идентификации органов эндокринной секреции у мышей / Н. К. Каширина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1987. – Т. 3, N 5. – С. 630–631.
141. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы (лабораторные животные) / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков. – Санкт-Петербург : Лань, 2001. – С. 159.
142. Быков, В. Л. Гистофизиология щитовидной железы в постнатальном онтогенезе / В. Л. Быков // Архив анатомии. – 1979. – Т. 66, вып. 3. – С. 80–94.
143. Хмельницкий, О. К. О возможностях и ограничениях морфологического исследования щитовидной железы / О. К. Хмельницкий // Архив патологии. – 1993. – Т. 55, N 5. – С. 5–11.
144. Хмельницкий, О. К. Функциональная морфология щитовидной железы в первые месяцы пубертатного периода / О. К. Хмельницкий // Архив анатомии. – 1983. – Т. 74, вып. 1. – С. 56–60.
145. Гербильский, Л. В. Морфофункциональное исследование щитовидной железы крыс в эмбриональном и раннем постнатальном периодах / Л. В. Гербильский // Актуальные проблемы развития человека и млекопитающих : труды КМИ. – Симферополь : КМИ, 1983. – С. 96–97.
146. Matthew Lindberg. Diagnostic Pathology: Normal Histology. – 2nd Ed. – 2017. – eBook ISBN: 9780323548052



147. The Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique edited by Peter Gray. – New York : VNR, 1980. – P. 547–551.
148. Международная гистологическая номенклатура (на латинском, русском и английском языках) / Под ред. В. В. Семченко, Р. П. Самусева, М. В. Моисеева, З. Л. Колосовой. – Омск : Омская медицинская академия, 1999. – 156 с.
149. Колесников, Л. Л. Международная анатомическая терминология (с официальным списком русских эквивалентов) / Л. Л. Колесников. – Можайск : ОАО Можайский полиграфический комбинат, 2003. – 423 с.
150. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2010. – 95 с.
151. Молекулярно-генетические исследования в онкологии / Под ред. В. В. Омеляновского, Е. Н. Имянитова. – Москва : Наука, 2021. – 208 с.
152. Правила проведения цитогенетических и молекулярно-генетических исследований в онкологии и онкогематологии / И. А. Демидова, Г. А. Цаур, М. Л. Филипенко [и др.]. – Москва, 2022. – 24 с. – На сайте РООМ. Электронное издание.
153. Алгоритмы биологической статистики : учебн.-метод. пособие / сост. С. П. Кожевников. – Ижевск : Изд. центр «Удмуртский университет», 2018. – 75 с.
154. Мидлтон, М. Р. Анализ статистических данных с использованием Microsoft Excel для Office XP / М. Р. Мидлтон. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2005. – 296 с.
155. Сидорчук, А. А. Инфекционные болезни лабораторных животных / А. А. Сидорчук, А. А. Глушков. – Москва : Лань, 2009. – 128 с.
156. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте (Современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / И. М. Трахтенберг, Р. Е. Сова, В. О. Шефтель [и др.]. – Москва : Медицина, 1978. – 176 с.
157. Шатурина, Л. П. Естественная резистентность. Лабораторный практикум / Л. П. Шатурина, И. Ю. Еремина, О. В. Злотникова. – Красноярск, 2006. – <http://www.kgau.ru/distance/resources/saturina/>

158. Krinke, G. J. *The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals)* / G. J. Krinke, G. R. Bullock, T. Bunton. – San-Diego : Academic Press, 2000. –756 p.
159. Lewi, P. J. *Toxicology reference data. - Wistar rat* / P. J. Lewi , R.P. Marsboom. – Amsterdam: Holland: Elsevier/North-Holland Biochemical Press, 1981. – 358 p.
160. Suckow, M. A. *The Laboratory Rat* / M. A. Suckow, S. H. Weibroth, C. L. Franklin – Burlington : Elsevier; Academic Press, 2006. – 912 p.
161. Перцов, С. С. Поведение внутриутробно стрессированных крыс в тесте "приподнятый крестообразный лабиринт" в разные периоды постнатального онтогенеза / С. С. Перцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. –Т. 174, N 9. – С. 268-273
162. Сотникова, Е. Д. Изменения в системе крови при стрессе / Е. Д. Сотникова // Вестник РУДН. Серия «Агрономия и животноводство». – 2009. – N 1. – С. 50–54.
163. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps / C. N. Jenne, C. H. Wong, F. J. Zemp [ et al.] // *Cell host & microbe*. – 2013. – Vol. 13, N. 2. – P. 169–180.
164. Diane B. Miller. Neuroendocrine aspects of the response to stress / Diane B. Miller, James P. O'Callaghan // *Metabolism*. – 2002. –Vol. 51, N 6, part B. – P. 5–10.
165. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: Implications for heart rate variability as a marker of stress and health / Julian F. Thayer, Fredrik Åhs, Mats Fredrikson [ et al.] // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2012. –Vol. 36, N 2. –P. 747–756.
166. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological “novelty” stress in freely moving rats / M. Buuse, S. A. Acker, M. Fluttert, E. R. Kloet // *Psychophysiology*. – 2001. – Vol. 38. – P. 490–499.
167. Gärtner, K. Stress response of rats to handling and experimental procedures / K. Gärtner, D. Büttner // *Laboratory Animals*. – 1980. – Vol. 14(3). – P. 267–274.

168. Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment / M. A. Matthay, R. L. Zemans // *Annu Rev Pathol.* – 2011. – Vol. 6. – P. 147–163.

169. Rat Model of Chronic Recurrent Airway Obstructions to Study the Sleep Apnea Syndrome / Ramon Farré, Maria Nácher, Anna Serrano-Mollar [ et al.] // *Sleep.* – 2007. – Vol. 30, N 7. – P. 930–933.

170. Deficient cardiovascular stress reactivity predicts poor executive functions in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder / Tatja Hirvikoski, Erik M.G. Olsson, Anna Nordenström [ et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology.* – 2011. – Vol. 33, N1. – P. 63–73.

171. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer : New Dimensions / D. Hanahan // *Cancer Discov.* – 2022. – Vol.12(1). – P. 31–46.

172. Green tea extract modulates lithium-induced thyroid follicular cell damage in rats / S. M. Zaki, G. H. A. Hussein, G. M. Helal [ et al.] // *Folia Morphol.* – 2021. – Vol. 81(3). – P. 594–605.

173. Вильям М. Кеттайл. Патофизиология эндокринной системы / Вильям М. Кеттайл, Рональд А. Арки. – Москва : Бином, 2007. – 335 с.

174. Хаитов Р. М. Иммуитет и рак / Р. М. Хаитов, З. Г. Кадагаидзе. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 256 с.