

УДК 616.71–001.5

© Е. И. Шурыгина, В. С. Полякова, В. А. Миханов, 2018

<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-2-90-94>

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ И ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗАХ В ХОДЕ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Е. И. Шурыгина, В. С. Полякова, В. А. Миханов

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Оренбург, Россия

*Цель* исследования – изучить динамику структурно-функциональных изменений в щитовидной и паращитовидных железах в ходе репаративного остеогенеза.

*Материал и методы.* Исследование выполнено на 40 половозрелых крысах-самцах линии «Вистар» массой  $180.0 \pm 10.0$  г. В опытной группе использована модель открытого перелома диафиза большеберцовой кости. Контрольная группа – интактная. Содержание и манипуляции над животными выполнялись в соответствии с «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Структурные изменения в костной мозоли, щитовидной и паращитовидных железах изучали с применением методов иммуногистохимии (с использованием антител anti-calcitonin, anti-Ki-67, anti-osteocalcin), световой микроскопии, морфометрии и статистики.

*Результаты.* В начальные сроки репаративного остеогенеза в паращитовидных железах повышается пролиферативная и функциональная активность главных эндокриноцитов, следствием чего является усиление остеокластической активности с резорбцией костных отломков в зоне перелома. С 21-х суток остеогенеза функциональная активность паращитовидных желез снижается, в щитовидной железе активизируется деятельность С-клеток: наблюдается увеличение относительной объемной плотности кальцитониноцитов. На этом сроке репаративного остеогенеза в зоне костной мозоли среди клеток преобладают остеобласты; наиболее высока относительная объемная плотность остеокальцина. В последующие сроки остеогенеза происходит снижение функциональной активности кальцитониноцитов.

*Заключение.* Наблюдаемые изменения синтетической и пролиферативной активности С-клеток и паратирицитов имеют определенный временной интервал, который коррелирует с гистогенезом костной ткани в зоне перелома.

*Ключевые слова:* остеогенез, паращитовидные железы, щитовидная железа, переломы, иммуногистохимия, остеокласты.

© Е. И. Shurygina, V. S. Polyakova, V. A. Mikhanov, 2018

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Morphological Changes in Thyroid and Parathyroid Glands During the Reparative Osteogenesis

The *aim* of the research is to study the dynamics of structural and functional changes in the thyroid and parathyroid glands during reparative osteogenesis.

*Material and methods.* The study was performed on 40 adult males rat of the Wistar line, weighing  $180.0 \pm 10.0$  g. A model of an open fracture of the tibial diaphysis was used in the experimental group. The control group was intact. Structural changes in bone callus, thyroid and parathyroid glands were studied using immunohistochemistry methods, light microscopy, morphometry and statistics.

*Results.* The proliferative and functional activity of the major endocrinocytes of the parathyroid glands is increased in the initial periods of reparative osteogenesis, resulting in an increasing of osteoclastic activity with resorption of bone fragments in the fracture zone. From 21th day of osteogenesis the functional activity of the parathyroid glands is reduced, the activity of the C-cells of the thyroid gland is activated; then the functional activity of C-cells is decreased.

*Conclusion.* The observed changes in the synthetic and proliferative activity of C-cells and parathyrocytes have a certain time interval, which correlates with the histogenesis of bone tissue in the fracture zone.

*Key words:* osteogenesis, parathyroid glands, thyroid gland, fractures, immunohistochemistry, osteoclasts.

### Введение

Во всем мире заболеваемость, связанная с поражением костной ткани, стремительно увеличивается и, как ожидается, к 2020 году удвоится [8]. Ежегодно 5–6 человек из каждых 100 жителей России получают травмы скелета [3]. Большинство заболеваний костной системы ассоциировано с остеопорозом и, как следствие, с увеличенной частотой костных переломов [9]. Поэтому изучение механизмов и регуляции посттравматической репарации костной ткани имеет фундаментальное значение для решения проблем практиче-

ской медицины. В отличие от большинства местных факторов, влияющих на остеорепарацию (степень кровоснабжения зоны перелома, эффективность репозиции и иммобилизации костных отломков), которые хорошо изучены, проблемы нейроэндокринной регуляции регенеративного остеогенеза освещены в литературе в меньшей мере. При этом в большинстве работ [2–4] внимание уделяется биохимическим аспектам, тогда как морфофункциональные особенности С-клеток щитовидных желез и паратирицитов околощитовидных желез представлены недостаточно полно.

Целью нашего исследования явилось изучение структурно-функциональных изменений щитовидной и паращитовидных желез в ходе репаративного остеогистогенеза.

### Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на 40 половозрелых крысах-самках линии «Вистар» массой  $180.0 \pm 10.0$  г. Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ №742 от 13.11.1984). В опытной группе (35 животных) использована модель открытого перелома большеберцовой кости. Под эфирным наркозом в асептических условиях на предварительно выбритой коже области средней трети правой голени, по передне-внутренней поверхности выполнен разрез 0.5 см глубиной до берцовых костей. С помощью костных кусачек осуществлена остеотомия средней трети большеберцовой кости. Рана ушита одним узловым швом. Проведена иммобилизация посредством сохранившей целостность малоберцовой кости. В контрольной группе (5 животных) с аналогичными условиями содержания и кормления перелом не воспроизводился. Животных выводили из опыта на 1-, 3-, 7-, 14-, 21-, 28-, 44- и 61-е сутки посредством летальной дозы эфирного наркоза.

Для морфологического исследования проводили взятие участка большеберцовой кости (из зоны перелома), а также щитовидной и паращитовидных желез. Фрагменты тканей размерами  $0.5 \times 1.0$  см фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, забуференном по Лилли, в течение суток. Затем кусочки костной ткани подвергли декальцинации в течение двух недель смесью трилон Б + 40% раствор NaOH + дистиллированная вода в соотношении 5.0 г : 1.0 мл : 20.0 мл соответственно. Весь материал был обезвожен в спиртах возрастающей крепости и залит в целлоидин-парафин по общепринятой методике [5]. Срезы тканей толщиной 4–6 мкм окрашены гематоксилином Майера и эозином. Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием моноклональных антител anti-calcitonin, anti-Ki-67 («SPRING Bioscience», США), anti-osteocalcin («GeneTex», США) и системы детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System («SPRING Bioscience», США). Просмотр и микрофотосъемка гистологических препаратов проведены на светооптическом микроскопе «Микмед-6» (ОАО «ЛОМО», Россия) [6].

Подсчет темных и светлых эндокриноцитов паращитовидных желез, а также клеток в зоне перелома проводили в 10 полях зрения на условной единице площади  $2.5 \times 2.5$  с использованием точечной сетки-вставки при

увеличении  $\times 400$ . При оценке экспрессии Ki-67 рассчитывали индекс пролиферации (ИП) по формуле:

$$\text{ИП} = (n^+ / N) \times 100\% ,$$

где  $n^+$  – число меченых ядер,  $N$  – общее число ядер в поле зрения микроскопа. Подсчеты произведены в 20 полях зрения среза при увеличении  $\times 300$  [1]. С помощью программы «Adobe Photoshop CS6 Extended» проведен морфометрический анализ зоны перелома и щитовидных желез (относительная площадь компонентов тканей). Относительную объемную плотность иммуногистохимически определяемых остеокальцина и кальцитонина рассчитывали по формуле:

$$\text{ООП} (\%) = (Sa / St) \times 100 ,$$

где ООП – относительная объемная плотность;  $Sa$  – суммарная площадь всех областей в анализируемом изображении, содержащих исследуемый белок;  $St$  – общая площадь цифровой микрофотографии. Площадь цифровой микрофотографии соответствовала одному полю зрения микроскопа при увеличении  $\times 300$ . Подсчет проводили в 20 полях зрения. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин ( $M$ ), ошибки средних величин ( $m$ ) и  $t$ -критерий Стьюдента. Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$  [7].

### Результаты и их обсуждение

В ходе репаративного гистогенеза костной ткани в околощитовидных железах уже с 1-х суток выявлено преобладание темных (функционально активных) паратироцитов, их число почти в 4 раза превышает эти показатели в органе интактных животных (рис. 1).

Преобладание функционально активных паратироцитов наблюдается до 14-х суток остеогенеза включительно. С 21-х суток содержание темных паратироцитов уменьшается на 70% и постепенно к 61-м суткам достигает показателей контрольных животных. О повышенной активности околощитовидных желез на ранних этапах репарации костной ткани можно судить по увеличению индекса пролиферации паратироцитов (рис. 2).

Пролиферативная активность увеличивается к 7-м суткам, а затем снижается в 3 раза к 14-м суткам, и далее постепенно достигает контрольных значений к 61-м суткам (рис. 3).

В щитовидной железе на ранних сроках репаративной регенерации костной ткани (1–3-е сутки) нами обнаружены: десквамация фолликулярного эпителия, вакуолизация коллоида, очаговая пролиферация фолликулярных клеток. Иммуногистохимические исследования с использованием антител anti-

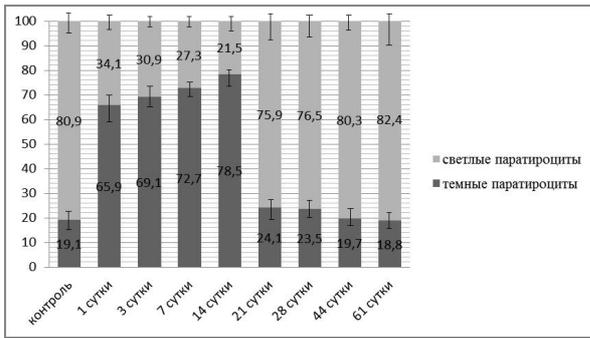


Рис. 1. Соотношение активных (темных) и неактивных (светлых) главных паратиреоцитов околощитовидных желез крыс на различных сроках репаративного остеогенеза. Обозначения: по оси абсцисс – сроки остеогенеза; по оси ординат – процентное соотношение паратиреоцитов в околощитовидных железах; вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

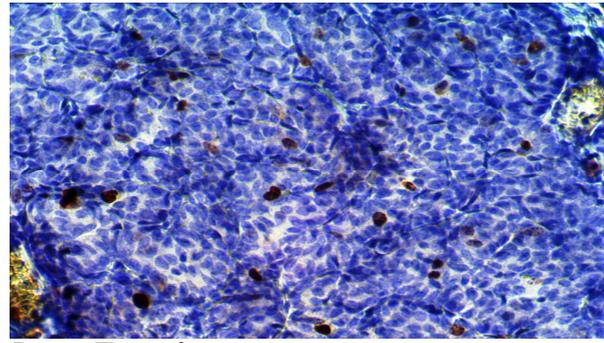


Рис. 2. Проллиферативная активность паратиреоцитов околощитовидных желез крыс на 1-е сутки репаративного остеогенеза. Иммуногистохимическое исследование с антителами anti-Ki-67. Экспрессия Ki-67 – коричневый цвет. Об. 20, ок.10.

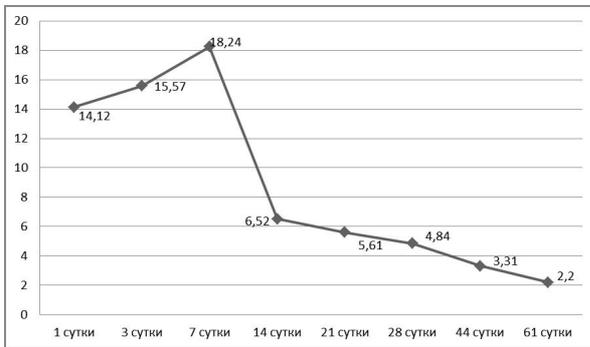


Рис. 3. Индекс пролиферации (ИП) паратиреоцитов околощитовидных желез крыс на различных сроках репаративного остеогенеза. Обозначения: по оси абсцисс – сроки остеогенеза; по оси ординат – значение ИП паратиреоцитов.

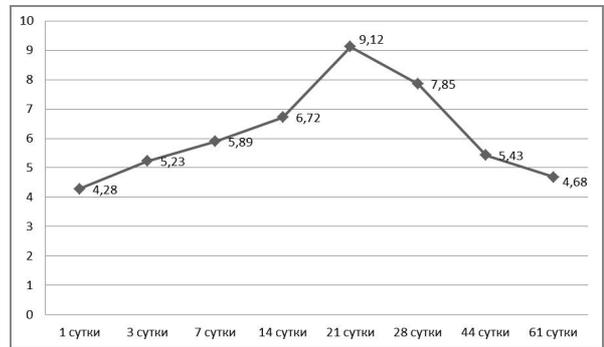


Рис. 4. Относительная объемная плотность (ООП) С-клеток (кальцитонин – положительно материала) щитовидных желез крыс на различных этапах репаративного остеогенеза. Обозначения: по оси абсцисс – сроки остеогенеза; по оси ординат – ООП кальцитониноцитов.

calcitonin показали, что в ранние сроки гистогенеза экспрессия этого белка среди С-клеток щитовидной железы достоверно отличается от показателей контрольной группы животных. Начиная с 14-х суток выявляются морфологические признаки функциональной активности парафолликулярных эндокриноцитов. К этому сроку достоверно по сравнению с 1-ми сутками увеличивается относительная объемная плотность С-клеток, экспрессирующих кальцитонин (рис. 4), которые определяются как интраэпителиально между фолликулярными клетками, так и в значительном количестве в межфолликулярных пространствах, чаще локализуясь рядом с капиллярами (рис. 5).

Максимальная относительная объемная плотность кальцитониноцитов отмечена на 21-е сутки ( $9.1 \pm 0.2$ ), что коррелирует с активным костеобразованием в зоне перелома. С 21-х суток популяция остеобластов превалирует в зоне перелома ( $43.1 \pm 1.2\%$ ). По сравнению с 1-ми сутками в 4 раза возрастает относительная объемная плотность остеокальцина ( $0.84 \pm 0.1$ ). В последующие сроки репаративного остеогенеза выявлено постепенное снижение объемной плотности кальцитони-

ноцитов до 61-х суток, когда значение данного параметра достоверно не отличается от такового в интактной группе.

В ходе репаративного остеогенеза из органов, участвующих в его регуляции, первыми повышают свою активность околощитовидные железы. Уже с 1-х суток эксперимента изменяется соотношение светлых (неактивных) и темных (функционально активных) эндокриноцитов в сторону последних. Увеличивается пролиферативная активность по показателям экспрессии Ki-67 среди паратиреоцитов. Морфофункциональные изменения в околощитовидных железах на ранних этапах остеогенеза в большей степени связаны со стрессом, имеющем место при костном переломе и сопровождаемым реакцией со стороны гипофиз – адреноловой системы, в ходе которой снижается уровень кальция в крови [4]. Структурные изменения в околощитовидных железах обуславливают развитие начальной фазы репаративного остеогенеза с превалированием процессов лизиса и резорбции костной ткани, которые обеспечиваются влиянием паратиреоидного гормона, продуцируемого главными эндокриноцитами, на активность остеокластов [2].

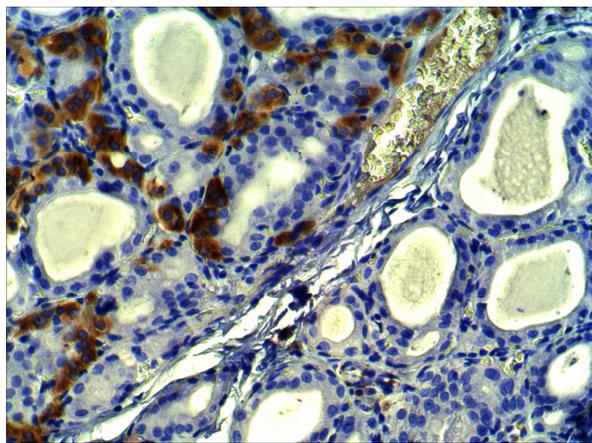


Рис. 5. Синтетическая активность кальцитонинотропов щитовидных желез крыс на 28-е сутки репаративного остеогенеза. Иммуногистохимическое исследование с антителами anti-calcitonin. Экспрессия кальцитонина – коричневый цвет. Об. 20, ок.10.

Признаки функциональной активности С-клеток щитовидной железы выявлены с 14-х суток эксперимента, когда значимо возрастает экспрессия кальцитонина среди парафолликулярных клеток, достигающая максимума к 21-м суткам. В эти сроки инициируется фаза ремоделирования костной мозоли. Кальцитонин – гормон, вырабатываемый С-клетками, проявляя ингибирующую роль в отношении остеокластов и стимулируя пролиферацию и дифференцировку остеобластов, определяет активное костеобразование в зоне перелома [2]. Выявленное нами значительное увеличение с 14-х суток относительной объемной плотности остеокальцина – белка, синтезируемого остеобластами на поздней стадии их созревания, является результатом регуляторной функции кальцитониноцитов и индикатором дифференцировки остеобластов [4].

### Заключение

Таким образом в процессе репаративного остеогенеза щитовидная и паращитовидные железы подвергаются значительным морфофункциональным изменениям, связанным с усилением пролиферативной и синтетической активности эндокриноцитов в ответ на перелом кости. Своевременная перестройка С-клеток и паратироцитов обуславливает оптимальную динамику процессов резорбции кости и остеорепарации, результатом чего является органотипическое восстановление костной ткани.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990. 384.

2. Болотов Д. Д., Куфтырев Л. М. Эндокринная регуляция репаративного процесса при возмещении межсегментарного дефекта костей в области коленного сустава методом чрескостного остеосинтеза. Гений Ортопедии. 2003; 2: 54–57.

3. Коржевский Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб: СпецЛит; 2012. 118.

4. Лаврищева Г. И., Оноприенко Г. А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М.: Медицина; 1996. 208.

5. Мятлев В. Д. Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели. М.: Академия, 2009. 320.

6. Свешников А. А., Патраков В. В., Ларионова Т. А. Гормональная регуляция репаративного костеобразования. Гений Ортопедии. 2008; 2: 22–27.

7. Семченко В. В., Барашкова С. А., Артемьев В. Н. Гистологическая техника. Омск: Омская областная типография; 2006. 102.

8. Amini A., Laurencin C., Nukavarapu S. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40 (5): 363–408.

9. Carulli C., Innocenti M., Brandi M. Bone Vascularization in Normal and Disease Conditions. Front Endocrinol (Lausanne). 2013; 4: 106–131.

### References

1. Avtandilov G.G. Meditsinskaya morfometriya [Medical morphometry]. M.: Meditsina; 1990. 384 (in Russian).

2. Bolotov D.D., Kufyrev L.M. Endokrinная regulyatsiya reparatorivnogo protsessa pri vozmeshchenii mezhsegmentarnogo defekta kostey v oblasti kolennogo sustava metodom chreskostnogo osteosinteza [Endocrine regulation of the reparative process in recovering of an intersegmental bone defect in the knee joint area by transosseous osteosynthesis]. Geniy Ortopedii. 2003; 2: 54–57 (in Russian).

3. Korzhevskiy D.E. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye metodov immunogistokhimii: rukovodstvo [Theoretical bases and practical application of methods of immunohistochemistry: a manual]. SPb: SpetsLit; 2012. 118 (in Russian).

4. Lavrishcheva G.I., Onoprienko G.A. Morfoloicheskie i klinicheskie aspekty reparatorivnoy regeneratsii opornykh organov i tkaney [Morphological and clinical aspects of reparative regeneration of supporting organs and tissues]. M.: Meditsina; 1996. 208 (in Russian).

5. Myatlev V.D. Teoriya veroyatnostey i matematicheskaya statistika. Matematicheskie modeli [Probability theory and mathematical statistics. Mathematical models]. M.: Akademiya, 2009. 320 (in Russian).

6. Sveshnikov A.A., Patrakov V.V., Larionova T.A. Gormonal'naya regulyatsiya reparatorivnogo kosteobrazovaniya [Hormonal regulation of reparative bone formation]. Geniy Ortopedii. 2008; 2: 22–27 (in Russian).

7. Semchenko V.V., Barashkova S.A., Artem'ev V.N. Gistologicheskaya tekhnika [Histological tech-

- nique]. Omsk: Omskaya oblastnaya tipografiya; 2006. 102 (in Russian).
8. Amini A., Laurencin C., Nukavarapu S. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012; 40 (5): 363–408.
  9. Carulli C., Innocenti M., Brandi M. Bone Vascularization in Normal and Disease Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 106-131.

**Сведения об авторах**

**Шурыгина Елена Ивановна** – ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Оренбургский

государственный медицинский университет» Минздрава России. 460000, Оренбург, ул. Советская, 6. E-mail: shuryginalena@mail.ru

**Полякова Валентина Сергеевна** – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. 460000, Оренбург, ул. Советская, 6.

**Миханов Василий Александрович** – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. 460000, Оренбург, ул. Советская, 6.

Поступила в редакцию 19.12.2017 г.

*Для цитирования:* Шурыгина Е. И., Полякова В. С., Миханов В. А. Морфофункциональные изменения в щитовидной и паращитовидных железах в ходе репаративного остеогенеза. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2018; 7(2): 90–94. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-90-94

*For citation:* Shurygina E. I., Polyakova V. S., Mikhanov V. A. Morphological changes in thyroid and parathyroid glands during the reparative osteogenesis. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2018; 7(2): 90–94. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-90-94