

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

УДК 616.441-006.5.092.9:615.832.91:616.003.93

ПОБЕЛЕНСЬКИЙ КОСТЯНТИН ОЛЕГОВИЧ

ДИСЕРТАЦІЯ
КРІОДЕСТРУКЦІЯ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ З ДИФУЗНОЮ
ГІПЕРПЛАЗІЄЮ НА ФОНІ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ
(експериментальне дослідження)

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Побеленський К.О.

Науковий керівник Легач Євген Іванович, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, в.о. зав.відділу кріоендокринології ІПКіК НАН України

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Побєленський К.О. Кріодеструкція щитоподібної залози з дифузною гіперплазією на фоні артеріальної гіпертензії (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (галузь знань 22 «Охорона здоров'я») Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

На сьогодні кріоабляція розглядається як мінімально інвазивний підхід до лікування доброякісних вузлових утворень щитоподібної залози (ЩЗ). Він має багато переваг, серед яких низька собівартість та малоінвазивність операції, можливість проведення кріодеструкції черезшкірно під контролем ендоскопічної техніки, зниження ризику кровотечі, мінімізація анестезії, скорочення часу операції та післяопераційного догляду. Більш того, особливість методу кріодеструкції, а саме формування зони проморожування (iceball), дає можливість чітко контролювати деструктивний вплив на тканину під час операції, оскільки завдяки зміненню фізичних характеристик зона проморожування візуалізується за допомогою МРТ та КТ.

Результат кріохірургічного втручання буде залежати від індивідуальних особливостей тканини, температури, яку генерує кріоаплікатор, часу експозиції, кількості циклів «заморожування-нагрівання». Крім того, як було раніше встановлено, параметри кровообігу (наявність крупних судин, площа мікроциркуляції тощо) тканини мають значний вплив на ефективність кріодеструкції, перешкоджаючи зниженню температури. Це є цілком справедливим для ЩЗ, оскільки вона відноситься до органів з великою швидкістю кровообігу та щільною васкуляризацією.

Гормональна дисфункція ЩЗ (гіпо- та гіпертиреоз) підвищує ризик виникнення артеріальної гіпертензії. Гістопатологічні зміни судинного русла за умов артеріальної гіпертензії впливають на теплопровідність та теплоємність тканини ЩЗ, а значить – й на результат її кріодеструкції.

Отже для оптимізації результатів кріохірургії ЩЗ та вибору тактики проведення кріодеструкції патологічно зміненої ЩЗ на фоні артеріальної гіпертензії є необхідним визначення коректного режиму кріовпливу (часу експозиції кріоаплікатора, цільової температури заморожування тканини, кількості кріовпливів).

Виходячи з вищенаведеного, дисертаційна робота присвячена вивченню впливу стану артеріальної гіпертензії на результат кріоабляції тканини ЩЗ, а також оптимізації режимів кріодеструкції ЩЗ з пропілтіоураціл-індукованою дифузною гіперплазією та оцінці активності регенеративних процесів у тиреоїдному залишку після кріодеструкції.

Для виконання роботи використовували спонтанно-гіпертензивні щури лінії SHR, які характеризуються генетично-детермінованими змінами у серцево-судинній системі. Патофізіологічні та патоморфологічні ознаки гіпертонії (підвищені показники систолічного тиску, фібротичні зміни судинного русла, потовщення стінки судин, гіперплазія гладеньком'язових клітин у *t. media*) у цієї лінії щурів найбільш близькі до таких у людини.

Пропілтіоурацил (ПТУ) є тиреостатиком, який широко застосовується для моделювання гіпотиреозу і гіперплазії ЩЗ у щурів. Він пригнічує синтез тиреоїдних гормонів шляхом пригнічення активності тиреопероксидази в ЩЗ і блокує перетворення тироксину в трийодтиронін на периферії. Спостережуване при цьому підвищення рівня ТТГ призводить до характерних патоморфологічних змін паренхіми ЩЗ, які виражаються в збільшенні висоти фолікулярного епітелію, зростанні ядерно-цитоплазматичного співвідношення тироцитів, фолікулярної гіпертрофії і гіперплазії.

На першому етапі роботи необхідним було вивчити специфічний та системний вплив ПТУ на спонтанно-гіпертензивних щурів для оцінки адекватності обраної моделі. У рамках вирішення цього завдання було проаналізовано динаміку морфологічних показників ЩЗ, рівню тиреоїдних гормонів, морфологічних характеристики нирок, печінки, селезінки, серця та

біохімічних показників крові (АЛТ, АСТ, сечовини, білірубін, креатинін) на різних термінах введення ПТУ. У якості нормотензивного контролю були залучені щури Вістар, оскільки лінія SHR була отримана з них за допомогою селективного інбридингу.

Встановлено, що при введенні 0,1% ПТУ впродовж 47 діб у ЩЗ гіпертензивних щурів спостерігається розвиток процесів гіпертрофії та гіперплазії, які виражаються у загальному підвищенні маси органу в середньому у 5,3 рази; збільшенні висоти фолікулярного епітелію на $75,5 \pm 4,3\%$, площі фолікулів на $9,1 \pm 2,3\%$, ядерно-цитоплазматичного відношення (ЯЦВ) тироцитів на $39 \pm 5,4\%$, появі патологічних фолікулів з сосочковими структурами та активації проліферації фібробластів у стромі органу. Прийом ПТУ у щурів лінії SHR призводив до морфофункціональних змін інших органів: порушення коронарного кровообігу і розвитку дистрофічних процесів у міокарді, які проявлялися зменшенням площі кардіоміоцитів, пікнозом ядер, зниженням щільності кардіоміоцитів і збільшенням обсягу сполучної тканини; підвищення середньої площі перерізу центральної артерії та трабекулярних вен селезінки, а також загальної площі венозних синусів за рахунок розширення просвіту судин та венозного повнокров'я; патологічних змін гістологічної структури печінки, венозної гіперемії і зростанні рівнів амінотрансфераз. Щури лінії SHR виявилися більш чутливими до тиреостатичної та гепатотоксичної дії ПТУ, ніж щури Вістар, що проявлялося в статистично значущому збільшенні показників висоти фолікулярного епітелію ЩЗ, кількості патологічних фолікулів, площі перерізу центральної вени печінкових часточок і рівнів амінотрансфераз крові.

Таким чином, експериментально було підтверджено адекватність обраної моделі та встановлені темпи розвитку патоморфологічних змін у тканині ЩЗ спонтанно-гіпертензивних тварин за умов індукції дифузної гіперплазії шляхом введення ПТУ.

Глиbokі зміни у структурі тканини ЩЗ, встановлені нами, повинні були вплинути на теплофізичні характеристики тканини, тому проведення порівняльної оцінки температурних змін в процесі кріовпливу на тканину ЩЗ в нормі та за умов дифузної гіперплазії було метою наступного етапу роботи. При аналізі кривих охолодження були отримані результати, які свідчили про відмінності характеристик нормальної тканини ЩЗ та тканини з дифузною гіперплазією.

Виявилося, що у разі ПТУ-індукованої дифузної гіперплазії відбувається збільшення довжини ділянки на кривій охолодження, що обумовлена взаємною компенсацією холодового впливу кріоаплікатора на тканину та питомої теплоти кристалоутворення, яка виділяється в процесі заморожування (для інтактної тканини – 22,0 (17,0; 27,0) с; для тканини з дифузною гіперплазією – 52,0 (48,0; 56,0) с). Таким чином, у модельній системі для обраного типу кріоаплікатора та його конфігурації було встановлено, що при однакових вихідних умовах для оптимізації режиму кріодеструкції тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією експозиція кріоаплікатору має бути підвищена в середньому у два рази.

При аналізі патоморфологічних змін тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією, підданою кріодеструкції, було встановлено, що вже на 21 добу після кріовпливу формується добре помітна зона фіброзу конусовидної форми. В зоні відсутня характерна для ЩЗ дольчасто-фолікулярна будова. Паренхіма залози заміщена сполучною тканиною з вираженою васкуляризацією та незначною лімфоцитарно-гістіоцитарною інфільтрацією. На периферії зони, рідше – у центрі, спостерігаються поодинокі мікрофолікули або їх скупчення.

Метою наступного етапу роботи була оцінка впливу гіпертензивного стану на результат кріодеструкції тканини ЩЗ. В ході проведення експериментів визначено, що кріовплив у обраному режимі не приводив до значущих змін площі зони фіброзу тканини ЩЗ у гіпер- та нормотензивних тварин інтактних груп. Статистично значуще зменшення показника

спостерігалось у зразках з ПТУ-індукованою гіперплазією ЩЗ у щурів обох ліній. При цьому, у гіпертензивних тварин з введенням ПТУ встановлено значуще зменшення показників Sf_{min} (на 60,9%) та Sf_{max} (на 42,1%), та тенденція до зменшення Sf_{med} (на 44,7%) в порівнянні з нормотензивними тваринами з введенням ПТУ. Це свідчило про те, що тканина ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією у гіпертензивних щурів є більш стійкою до кріоабляції. Цей факт може пояснюватися встановленими нами даними про те, що ЩЗ спонтанно-гіпертензивних щурів є більш чутливою до дії ПТУ та у більшій мірі набуває патологічних змін.

На наступному етапі роботи була проведена оцінка активності процесів репаративної регенерації ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією у порівняльному аспекті після кріодеструкції та резекції.

Значуще збільшення рівня ТТГ було встановлено у щурів з кріодеструкцією та резекцією через 30 діб після операції. Однак на 60-ту і 120-ту добу ці відмінності нівелювалися, що свідчило про активне протікання репаративно-відновлювальних процесів у ЩЗ у обох випадках.

Аналіз гістологічних та імуногістохімічних ознак регенеративних процесів у тиреоїдному залишку (збільшення ВФЕ, підвищення кількості С-клітин, інтерфоллікулярних острівців з яких, як було показано раніше, виникають нові фолікули, фолікулів неправильної форми, кількості Ki-67-позитивних клітин) на 30-ту та 60-ту добу у тварин з резекцією та кріодеструкцією показав значне збільшення усіх показників порівняно з хибнооперованим контролем. Однак при порівнянні ознак регенеративних процесів між групами з кріодеструкцією та резекцією, статистично значуще збільшення кількості С-клітин (кріодеструкція – 78,0 (61,3; 91,9); резекція – 106,3 (100,4; 117,2)), інтерфоллікулярних острівців (кріодеструкція – 5,0 (4,4; 5,3); резекція – 7,5 (7,2; 8,1)) та кількості Ki-67-позитивних клітин у 1,5 рази відбувалося у щурів після резекції.

Таким чином, як після резекції, так й після кріодеструкції, в тиреоїдному залишку спостерігалися процеси репаративної регенерації, однак у останньому випадку процеси неофолікулогенезу протікали менш активно.

Як відомо, механічне пошкодження біооб'єкту відбувається не тільки на етапі заморожування, але при його нагріванні за рахунок розвитку процесу рекристалізації. Причому інтенсивність рекристалізаційних процесів тим більше, чим вище була швидкість охолодження на етапі заморожування.

Виходячи з цього, на наступному етапі роботи було вивчено вплив контактного нагрівання на результат кріодеструкції тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією. Для цього після кріодеструкції у обраному режимі здійснювали нагрівання тканини ЩЗ за двома способами: 1) неконтрольоване нагрівання (НН), при якому тканина відігрівалася за рахунок теплообміну з навколишнім середовищем; 2) контактне нагрівання (КН), при якому до місця кріовпливу прикладали мідний аплікатор, нагрітий до температур 40, 50 та 60°C. Нагрівання припиняли, коли температура термопари, прикладеної до тканини ЩЗ, досягла 30°C. У гістологічних зрізах ЩЗ оцінювали площу зони фіброзу, сформованої на 21 добу після заморожування-нагрівання тканини ЩЗ.

Було відмічено, що при використанні КН змінювалася форма зони фіброзу. Якщо при НН зона фіброзу зазвичай є конусоподібною, то при КН вона поширювалась та набувала форми півкола. Статистично значуще підвищення у 2,5-3 рази середньої площі зони фіброзу було встановлено за умов використання КН порівняно з НН. Однак статистично значущої різниці між використаними температурами КН (40, 50 та 60°C) не було встановлено.

Таким чином, КН призводило до більш виражених деструктивних процесів в тканині ЩЗ в порівнянні з конвективним нагріванням, та підвищувало ефективність кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ.

Ключові слова: щитоподібна залоза, кріодеструкція, дифузна гіперплазія, артеріальна гіпертензія, пропілтіоурацил.

ANNOTATION

Pobielienskyi K.O. Cryodestruction of thyroid gland with diffuse hyperplasia on the background of arterial hypertension (experimental study). – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Philosophy Doctor in specialty 222 "Medicine" (field of study 22 "Healthcare"). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

Currently, cryoablation is considered as a minimally invasive approach to the treatment of benign thyroid nodules. It has many advantages, including low cost and minimally invasive procedure, the ability to perform cryoablation percutaneously under the control of endoscopic techniques, reduced risk of bleeding, minimization of anesthesia, shortening the time of surgery and postoperative care. Moreover, the peculiarity of the cryoablation method, namely the formation of a freezing zone (iceball), makes it possible to distinctly control the destructive effect on the tissue during the surgery, since the freezing zone is visualized at MRI and CT due to the change in physical characteristics.

The outcome of cryosurgical intervention will depend on the individual characteristics of the tissue, the temperature generated by the cryoprobe, exposure time, and the number of freeze-heating cycles. In addition, as it has been previously established, the parameters of blood circulation (the presence of large vessels, area of microcirculation etc.) of the tissue greatly affected the efficiency of cryoablation, preventing a decrease in temperature. This is quite true for the thyroid gland, since it belongs to organs with a high blood circulation rate and vascularization density.

Hormonal dysfunction of the thyroid gland (hypo- and hyperthyroidism) increases the risk of arterial hypertension. Histopathological changes in the vascular bed in conditions of arterial hypertension affect the thermal conductivity and heat capacity of the thyroid tissue, and hence the cryoablation outcome. Thus, in order to optimize the results of cryosurgery of the thyroid gland and the choice

of tactics for cryoablation of the pathologically altered thyroid gland against the background of arterial hypertension, it is necessary to determine the correct mode of cryotherapy (time of cryoprobe exposure, sufficient for freezing temperature, number of cryoablation cycles).

Based on the abovementioned, the thesis is devoted to the study of the effect of cryoablation in various modes on the histopathological parameters of the thyroid gland with propylthiouracil-induced diffuse hyperplasia and the level of thyroid hormones in normo- and hypertensive rats, as well as the comparative assessment of the activity of regenerative processes in the thyroid residue after cryoablation or resection.

Spontaneously hypertensive rats, which are characterized by genetically determined changes in the cardiovascular system, were used to perform the work. Pathophysiological and pathomorphological signs of hypertension (increased systolic pressure, fibrous changes in the vascular bed, thickening of the vascular wall, hyperplasia of smooth muscle cells in *t. media*) in this rat strain are closest to those in humans.

Propylthiouracil (PTU) is an antithyroid agent that is widely used for obtaining of thyroid gland hypothyroidism and hyperplasia in rats. It reduces the synthesis of thyroid hormones by inhibiting the activity of thyroperoxidase in the thyroid gland and blocking the conversion of thyroxine to triiodothyronine in the periphery. The observed increase in TSH levels leads to characteristic morphological changes in the parenchyma of the thyroid gland, which are expressed in an increase in the height of the follicular epithelium (HFE), an increase in the nuclear-cytoplasmic ratio (NCR) of thyrocytes, follicular hypertrophy and hyperplasia.

At the first stage of the work it was necessary to study the specific and systemic influence of PTU on spontaneously hypertensive rats to assess the adequacy of the selected model. As part of this task, the dynamics of morphological parameters of the thyroid gland, thyroid hormone levels, morphological characteristics of the kidneys, liver, spleen, heart and blood

biochemical parameters (ALT, AST, urea, bilirubin, creatinine) on the different terms of PTU administration were analyzed. Wistar rats were used as a normotensive control because the SHR strain was derived from them by selective inbreeding.

It was established the development of hypertrophic and hyperplastic processes in the thyroid gland of hypertensive rats at introduction of 0.1% of PTU within 47 days, which manifested in increase in thyroid gland weight in 5.3 times, HFE by $75.5 \pm 4.3\%$, the area of follicles by $9.1 \pm 2.3\%$, thyrocyte NCR by $39 \pm 5.4\%$, and appearance of pathological follicles with papillary structures and activation of fibroblast proliferation in the stroma of the organ. Administration of PTU in SHR rats led to coronary circulation disorders and the development of dystrophic processes in the myocardium, which were manifested in a decrease in the area of cardiomyocytes, pyknosis of the nuclei, decreased cardiomyocyte density and increased connective tissue volume; in an increase in the average cross-sectional area of the central artery and trabecular veins of the spleen, as well as the total area of the venous sinuses by expanding the lumen of blood vessels and venous plethora; pathological changes in the histological structure of the liver, venous hyperemia and increase levels of aminotransferases. SHR rats were more sensitive to thyrostatic and hepatotoxic effects of PTU than Wistar rats, which was manifested in a statistically significant increase in HFE, the number of pathological follicles with papillary structures, the area of the central vein of the liver lobules and blood aminotransferase levels.

Thus, the adequacy of the selected model was experimentally confirmed and the rate of development of histopathological changes in the thyroid tissue of spontaneously hypertensive animals under conditions of induction of diffuse hyperplasia by the introduction of PTU was established.

The profound changes in the structure of thyroid tissue, which we found, should have influenced on the thermophysical characteristics of the tissue, so a comparative assessment of temperature changes in the process of cryotherapy on normal thyroid tissue and with diffuse hyperplasia was the goal of the next stage.

In the analysis of cooling curves, results were obtained that showed differences in the characteristics of normal thyroid tissue and tissue with diffuse hyperplasia.

It turned out that PTU-induced diffuse hyperplasia was characterized by an increase in the length on the cooling curve section, which due to the mutual compensation of the cold effect of the cryoprobe on the tissue and the specific heat of crystal formation released during freezing (for intact tissue – 22.0 (17.0; 27.0) s; for tissue with diffuse hyperplasia – 52.0 (48.0; 56.0) s). Thus, in the model system for the selected type of cryoprobe and its configuration, it was found that to optimize the cryodestruction of thyroid tissue with diffuse hyperplasia the exposure of the cryoprobe should be doubled on average under the same initial conditions.

In the analysis of pathomorphological changes in the tissue of the thyroid gland with diffuse hyperplasia, subjected to cryoablation, it was found that a well-marked area of cone-shaped fibrosis was formed already on the 21st day after cryopreservation. There was no lobular-follicular structure characteristic of the thyroid gland in the area. The parenchyma of the gland was replaced by connective tissue with pronounced vascularization and weak lymphocytic-histiocytic infiltration. On the periphery of the zone, less often in the center, single microfollicles or their accumulations were observed.

The aim of the next stage was to assess the effect of hypertension on the outcome of thyroid tissue cryodestruction. As a result of experiments, it was found that cryotherapy in the selected mode did not lead to significant changes in the area of thyroid fibrosis in hyper- and normotensive animals of intact groups. A significant reduction of the index was observed in samples with PTU-induced thyroid hyperplasia in rats of both strains. At the same time, SHR rats had a smaller fibrosis area compared to Wistar rats. This suggested that thyroid tissue with PTU-induced hyperplasia in hypertensive rats was more resistant to cryoablation. This fact can be explained by the data established by us that the thyroid gland of spontaneously hypertensive rats is more sensitive to the PTU action, and undergoes more pathological changes.

At the next stage of the work, the activity of reparative regeneration in the thyroid gland with PTU-induced diffuse hyperplasia was comparatively evaluated after cryoablation and resection.

A significant increase in TSH levels was found in rats with cryoablation and resection on the 30th day after surgery. However these differences disappeared on the 60th and 120th days, which indicated the active reparative and restorative processes in the thyroid gland in both cases.

Analysis of histological and immunohistochemical signs of regenerative processes in the thyroid gland (HFE growth, an increased the number of C-cells, interfollicular islets from which, as shown earlier, new follicles arose, follicles of irregular shape, number of Ki-67-positive cells) on the 30th and 60th days in animals with resection and cryoablation showed a significant increase in all indices compared with the sham-operated control. However, when comparing the signs of regenerative processes between the groups with cryoablation and resection, a significant increase in the number of C-cells (cryodestruction – 78.0 (61.3; 91.9); resection – 106.3 (100.4; 117.2)), interfollicular islets (cryodestruction – 5.0 (4.4; 5.3); resection – 7.5 (7.2; 8.1)) and the number of Ki-67-positive cells occurred in rats after resection.

Thus, both after resection and after cryoablation, the processes of reparative regeneration were observed in the thyroid residue, but the neofolliculogenesis was less active after cryoablation than after resection.

As is well known mechanical damage to a biological object occurs not only at the stage of freezing, but also during its heating due to the recrystallization development. Moreover, the higher the cooling rate at the freezing stage, the higher the intensity of the recrystallization processes.

Based on this, the next stage of the research included the study of the effect of contact heating on the result of cryoablation of thyroid tissue with diffuse hyperplasia was studied. To do this, after cryoablation in the selected mode, the thyroid tissue was heated in two ways: 1) uncontrolled heating (UH), where the tissue was heated by heat exchange with the environment; 2) contact heating (CH),

in which a copper applicator heated to the temperatures of 40, 50 and 60°C was applied to the zone of cryotherapy. Heating was stopped when the temperature of the thermocouple applied to the thyroid tissue reached 30°C. In histological sections of the thyroid gland, it was assessed the area of the fibrosis formed on the 21st day after freeze-heating of the thyroid tissue.

It was noted that the use of CH changed the shape of the fibrosis zone. If during UH the fibrosis zone was conical, then under CH it expanded and acquired the shape of a semicircle. A significant increase by 2.5-3 times the average area of the fibrosis zone was found when using CH compared to UH. However, no significant difference between the contact heating temperatures used (40, 50 and 60°C) was found.

Thus, CH leads to more pronounced destructive processes in the thyroid tissue compared to the convection heating and increases the efficiency of cryoablation of pathologically altered thyroid tissue.

Key words: thyroid gland, cryoablation, diffuse hyperplasia, hypertension, propylthiouracil

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Побелєнський КО**, Колот НВ, Проценко ОС, Падалко ВІ, Божок ГА, Легач ЄІ, Побелєнський ОМ. Динаміка морфологічних показників щитоподібної залози у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. *Morphologia*. 2019; 13 (3): 93-98.
 2. **Побелєнський КО**, Побелєнська ЛА, Легач ЕІ, Побелєнський ОН. Сравнительное изучение результатов резекции и криодеструкции щитовидной железы в эксперименте. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020; 2(156): 286-289.
 3. **Побелєнський КО**, Олефіренко ОО, Побелєнський ОМ, Легач ЄІ, Побелєнська ЛА. Порівняльні результати криодеструкції щитоподібної залози у щурів лінії SHR та Вістар. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна серія медицина*. 2020; 40: 70-79.
 4. **Pobelensky КО**, Kolot NV, Protsenko ES, Legach EI, Bozok GA. Morphological Parameters of the Myocardium in Spontaneously Hypertensive Rats upon Administration of Propylthiouracil. *Recent Advances in Biology and Medicine*. 2021: 1-3.
- Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus*
5. **Побелєнський КО**, Легач ЕІ, Побелєнський ОН, Побелєнська ЛА. Биохимические показатели крови и морфологические характеристики щитовидной железы, почки и печени нормотензивных и гипертензивных крыс на фоне введения пропилтиоурацила. *Проблеми ендокринної патології*. 2020; 2(72): 111-118.
 6. **Побелєнський КО**, Пахомов ОВ, Гуріна ТМ, Побелєнська ЛА, Легач ЄІ, Божок ГА. Експериментальна криодеструкція щитоподібної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021;31(2): 168-179.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

7. Проценко ОС, Колот НВ, **Побеленський КО**, Побеленський ОМ, Падалко ВІ, Шаповал ОВ, Божок ГА, Легач ЄІ. Морфологічні зміни нирок у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. Матеріали ІІІ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології»; 2019 Жовтня 9-11; Дніпро, Україна, с. 113-115.
8. **Побеленський КО**, Легач ЄІ, Побеленський ОМ, Побеленська ЛА, Бондаренко ТП. Вивчення впливу пропілтіоурацилу на морфологічні характеристики фолікулярного епітелію щитоподібної залози щурів лінії SHR. VI з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом; 2019 Червня 18-21, Яремча, Україна, с. 59.
9. **Побеленський КО**, Легач ЕІ, Побеленський ОН, Побеленская ЛА. Гистопатологические характеристики ткани щитовидной железы крыс после криовоздействия. Проблеми кріобіології і кріомедицини 2019; 29(2): 188.
10. **Побеленський КО**, Побеленська ЛА, Шерстюк СО, Побеленський ОМ. Морфологічні зміни фолікулярного епітелію щитоподібної залози при використанні пропілтіоурацилу у гіпертензивних щурів лінії SHR. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 215-ї річниці заснування медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2020 Березня 26-27; Харків, Україна, с. 196-197.
11. **Побеленський КО**. Гістопатологічні характеристики тканини щитоподібної залози з пропілтіоурацил-ундукованою дифузною гіперплазією після кріодеструкції. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 215-ї річниці заснування медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2020 Березня 26-27; Харків, Україна, с. 195-196.
12. **Побеленський КО**, Гуріна ТМ, Легач ЄІ, Побеленська ЛА. Вплив контрольованого нагріву на результат кріодеструкції тканини щитоподібної залози. IX Міжнародна науково-практична конференція «Dynamics of the

development of world science». 2020 Травня 13-15; Ванкувер, Канада; с. 838-842.

13. **Побеленский КО**, Легач ЕИ, Божок ГА. Влияние пропилтиоурацила на некоторые морфологические характеристики щитовидной железы гипертензивных крыс линии SHR. Тези конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ ст.». 2019 Квітня 19-20; Одеса, Україна, с. 104-105.

14. Божок ГА, Гурина ТМ, **Побеленский КО**, Пахомов АВ, Ревенко ЕБ, Легач ЕИ. Разработка методологического подхода к криодеструкции патологически измененной ткани щитовидной железы с использованием контролируемого охлаждения-нагрева. Тези VI Петербургського міжнародного онкологічного форуму «Белые ночи». 2020 Червня 25-28; Санкт-Петербург, Российская Федерация; с. 171.

15. **Побелєнський КО**, Легач ЄІ. Віддалені результати кріодеструкції щитоподібної залози у щурів із моделлю дифузної гіперплазії. Тези доповідей конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині». 2020; Харків, Україна; Проблеми кріобіології і кріомедицини 30(3)2020 с. 285.

16. **Побелєнський КО**, Колот НВ, Побелєнська ЛА. Вплив пропілтіоурацилу на кровообіг селезінки у щурів з артеріальною гіпертензією. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 25-ї річниці заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2021 Квітня 22-23; Харків, Україна; с. 129-131.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Патології щитоподібної залози, що супроводжуються артеріальною гіпертензією	29
1.2. Сучасні підходи до лікування дифузної гіперплазії щитоподібної залози	35
1.3. Сучасні підходи у клінічній кріохірургічній практиці	39
1.3.1. Загальні механізми кріоушкодження клітин	39
1.3.2. Основні принципи кріохірургії	41
1.3.3. Кріохірургічна техніка	45
1.4. Використання кріохірургії у клінічній практиці	48
РОЗДІЛ II. Матеріали і методи дослідження	54
2.1. Експериментальні тварини	54
2.2. Моделювання дифузної гіперплазії щитоподібної залози	54
2.3. Кріодеструкція щитоподібної залози	54
2.4. Нагрівання тканини щитоподібної залози після кріодеструкції	56
2.5. Контролювання процесів охолодження-нагрівання	56
2.6. Отримання сироватки крові	57
2.7. Визначення рівню тиреоїдних гормонів та ТТГ	57
2.8. Визначення рівню АЛТ та АСТ	58
2.9. Визначення рівню білірубіну	58
2. 10. Визначення рівнів сечовини та креатиніну	58
2.11. Забарвлення гематоксиліном і еозином	58
2.12. Світлова мікроскопія	58
2.13. Визначення морфологічних показників тканин різних органів	59

2.14. Визначення площі зони фіброзу, сформованого у місці кріодеструкції щитоподібної залози	60
2.15. Імуногістохімічне визначення маркера проліферації Ki-67	61
2.16. Резекція щитоподібної залози	61
2.17. Групи експериментальних тварин	62
2.18. Статистична обробка результатів	63
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ПРОПІЛТІОУРАЦИЛУ НА ЩИТОПОДІБНУ ЗАЛОЗУ, ПЕЧІНКУ, НИРКИ, СЕРЦЕ ТА СЕЛЕЗІНКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR ТА ВІСТАР	64
3.1. Вплив ПТУ на морфологічні показники щитоподібної залози щурів лінії SHR та Вістар	64
3.2. Вплив ПТУ на морфологічні та біохімічні показники печінки та нирок щурів ліній SHR та Вістар	73
3.3. Вплив ПТУ на морфологічні показники селезінки щурів	78
3.4. Вплив ПТУ на морфологічні показники серця щурів	81
РОЗДІЛ 4. ВИЗНАЧЕННЯ РЕЖИМУ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ З ПРОПІЛТІОУРАЦИЛ-ІНДУКОВАНОЮ ДИФУЗНОЮ ГІПЕРПЛАЗІЄЮ	85
РОЗДІЛ 5. ПОРІВНЯЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR ТА ВІСТАР	97
РОЗДІЛ 6. ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РЕЗЕКЦІЇ ТА КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR	102
РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ КОНТАКТНОГО НАГРІВАННЯ У ЦИКЛІ «ЗАМОРОЖУВАННЯ-НАГРІВАННЯ» НА РЕЗУЛЬТАТ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ТКАНИНИ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ	109
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	118
ВИСНОВКИ	130

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	133
Додаток А	163
Додаток Б	166

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія
АЛТ – аланінамінотрансфераза
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АТП – антитиреоїдні препарати
АТФ – аденозинтрифосфат
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
ВС – венозний синус
ВФЕ – висота фолікулярного епітелію
ДВУ – доброякісні вузлові утворення
ДГ – дифузна гіперплазія
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ДТЗ – дифузний токсичний зоб
ІР – інтерквартільний розмах
ІФА – імуноферментний аналіз
ІФО – інтерфоллікулярні островці
КН – контактне нагрівання
КТ – комп'ютерна томографія
ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності
МРТ – магніто-резонансна томографія
НН – неконтрольоване нагрівання
ПЗ – поле зору
ПОЛ – перекисне окислювання ліпідів
ПТУ – пропілтіоурацил
ССС – серцево-судинна система
Т/ФБ– відношення кількості тироцитів до фібробластів
ТЗ – трийодтиронін
Т4 – тироксин
ТВ – трабекулярна вена
ТГ – тиреоїдні гормони

ТП – термопара

ТТГ – тиреотропний гормон

УЗД – ультразвукова діагностика

ФНФ – фолікули неправильної форми

ЦА – центральна артерія

ЩЗ – щитоподібна залоза

ЯЦВ – ядерно-цитоплазматичне відношення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

За дослідженнями останніх років, в світі збільшується поширеність гіпер- та гіпотиреозу, особливо в районах з неблагополучним йодним статусом [1]. Наприклад, в США тиреотоксикоз реєструється у 100-200 випадках на 100 тисяч населення в рік, хоча раніше цей показник становив 30 випадків на ту ж кількість. Поширеність гіпотиреозу коливається від 0,2% до 5,3% населення в Європі та від 0,3% до 3,7% - в США. В Україні в останні роки нараховується близько 0,3% пацієнтів, які перебувають на офіційному медичному обліку за діагнозом гіпотиреоз [2], а частота дифузного токсичного зобу (ДТЗ) в середньому по Україні складає 80-83 випадки на 100 тисяч населення [3]. Обидва порушення функції щитоподібної залози (ЩЗ), як гіпо- так й гіпертиреоз, можуть збільшити ризик виникнення артеріальної гіпертензії [4, 5, 6]. Отже комплексні дослідження, спрямовані на вивчення перебігу тиреоїдної патології на фоні гіпертонії, є актуальними.

При хірургічному втручанні з приводу вузлових утворень ЩЗ є ризик ускладнень (гіпотиреоз, гіпопаратиреоз, пошкодження гортанного нерву), які спостерігаються у 2-10% прооперованих пацієнтів [7]. З огляду на це, актуальним є розробка малоінвазивних хірургічних методів лікування, серед яких кріодеструкція (кріоабляція) стає все більш поширеною. Кріохірургія ЩЗ має ряд переваг, серед яких малоінвазивність операції, зниження ризику кровотечі, мінімізація анестезії, оскільки заморожування має знеболюючу дію, «кріоімунологічний» ефект, скорочення часу операції та післяопераційного догляду, низька собівартість та хороший косметичний результат [8, 9, 10]. Також цей метод стає особливо привабливим завдяки можливості проведення черезшкірної операції під візуальним контролем з використанням ендоскопічної техніки [11, 12]. Кріоабляція включена до методичних рекомендацій Американської асоціації з лікування щитоподібної

залози як альтернативний метод лікування вузлів та диференційованого раку ЩЗ [12, 13].

Як відомо, резекція активізує гіперпластичні процеси в щитовидній залозі [14, 15, 16]. Щодо активного клінічного використання кріоабляції ЩЗ накопичено недостатньо інформації, зокрема, що стосується тяжкості перебігу післяопераційного періоду та швидкості регенерації тиреоїдного залишку. Крім того, патологічно змінена тканина ЩЗ відрізняється від нормальної за теплофізичними характеристиками. У зв'язку з цим, для вибору тактики проведення кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ актуальною є розробка моделі на лабораторних тваринах.

Пропілтіоурацил (ПТУ) є тиреостатиком, який широко застосовується для моделювання гіпотиреозу і гіперплазії ЩЗ у щурів. Він пригнічує синтез тиреоїдних гормонів шляхом пригнічення активності тиреопероксидази в ЩЗ і блокує перетворення тироксину в трийодтиронін на периферії. Спостережуване при цьому підвищення рівня ТТГ призводить до характерних патоморфологічних змін паренхіми ЩЗ, які виражаються в збільшенні висоти фолікулярного епітелію, зростанні ядерно-цитоплазматичного співвідношення тироцитів, фолікулярної гіпертрофії і гіперплазії.

Спонтанно-гіпертензивні щури лінії SHR широко використовуються для вивчення ряду патологій, включаючи серцево-судинні захворювання, метаболічний синдром, стійкість до інсуліну, порушення ліпідного обміну [17, 18, 19]. Патофізіологічні та патоморфологічні ознаки гіпертонії у щурів цієї лінії найближчі до таких у людини [20, 21]. Отже саме вони були обрані у нашій роботі для моделювання пропілтіоурацил-індукованої гіперплазії ЩЗ. Оскільки лінія SHR була отримана за допомогою селективного інбридингу щурів Вістар, останні використовували у якості контролю.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокрінології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних тем

«Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (шифр – 2.2.6.104, № державної реєстрації 0116U003494) та «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребеня» (шифр – 2.2.6.134, № державної реєстрації 0121U100).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – вивчення впливу стану артеріальної гіпертензії на результат кріодеструкції нормальної та патологічно зміненої тканини щитоподібної залози щурів, а також оптимізація режиму кріодеструкції щитоподібної залози з дифузною гіперплазією та оцінка швидкості репаративних процесів у тиреоїдному залишку після кріодеструкції.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити наступні **завдання:**

1. Вивчити динаміку морфологічних показників ЩЗ та рівню тиреоїдних гормонів у гіпертензивних тварин на різних термінах введення ПТУ у порівняльному аспекті з нормотензивними тваринами.

2. Дослідити морфологічні характеристики нирок, печінки, селезінки, серця та біохімічні показники крові (АЛТ, АСТ, сечовини, білірубину, креатиніну) у гіпертензивних щурів на різних термінах введення ПТУ.

3. Визначити режим кріодеструкції ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією на основі вивчення температурних змін під час кріовпливу та гістологічних змін тканини ЩЗ після кріовпливу.

4. Визначити вплив стану артеріальної гіпертензії на результат кріодеструкції інтактної ЩЗ та ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією.

5. Оцінити активність процесів репаративної регенерації після резекції або кріодеструкції ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією у щурів з артеріальною гіпертензією.

6. Визначити вплив активного контактного нагрівання у циклі «заморожування-нагрівання» на результат кріодеструкції ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією у щурів з артеріальною гіпертензією.

Об'єкт дослідження – деструктивні та відновлювальні процеси в тканині щитоподібної залози після введення пропілтіоурацилу та кріодеструкції у різних режимах у щурів з артеріальною гіпертензією.

Предмет дослідження – різні режими кріодеструкції тканини щитоподібної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією у нормо- та гіпертензивних щурів.

Методи дослідження. У роботі були використані методи моделювання тиреоїдної патології на тваринах (дифузна гіперплазія та резекція щитоподібної залози), кріоабляція тканини щитоподібної залози, контактна термометрія, імуноферментний аналіз рівню гормонів (Т3, Т4 та ТТГ), біохімічний аналіз рівню сечовини, білірубіну, креатиніну, амінотрансфераз (АЛТ та АСТ), імуногістохімічне визначення Ki-67, гістологічний та морфометричний аналіз, світлова мікроскопія, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів.

Уперше встановлено, що стан артеріальної гіпертензії не впливає на результат кріодеструкції щитоподібної залози у інтактних тварин. Однак після маніфестації патологічних змін, характерних для ПТУ-індукованих гіперпластичних процесів, спостерігається підвищення стійкості тканини щитоподібної залози гіпертензивних тварин до кріодеструкції. *Уперше визначено* вплив відмінностей у теплофізичних характеристиках патологічно зміненої під дією тиреостатика ПТУ тканини щитоподібної залози на параметри її кріоабляції, а також профіль гістологічних змін щитоподібної залози з дифузною гіперплазією, який спостерігається після кріоабляції за різних режимів кріовпливу. Визначено, що за умов ПТУ-індукованої дифузної гіперплазії тканина щитоподібної залози щурів лінії SHR є більш стійкою до кріовпливу у використаних режимах порівняно з щурами Вістар. *Уперше порівняно* гістологічні ознаки регенеративних процесів у тканині

щитоподібної залози після резекції та кріоабляції, на основі чого доведено, що процеси неофолікулогенезу протікають менш активно після кріоабляції, ніж після резекції. *Уперше встановлено*, що ефективність кріодеструкції може бути підвищена за рахунок використання контактного нагрівання тканини у циклі «заморожування-нагрівання».

Практичне значення отриманих результатів.

Результати виконаного наукового дослідження мають практичне значення для визначення оптимального режиму клінічної кріоабляції тканини щитоподібної залози з дифузною гіперплазією на фоні артеріальної гіпертензії. Відтворений у роботі підхід до посилення розвитку процесів рекристалізації за рахунок контактного нагрівання тканини у циклі «заморожування-нагрівання» може бути застосований для розробки нових технологій кріоабляції та впровадження їх у клінічну практику.

Експериментальні результати щодо оцінки швидкості процесів репаративної регенерації тиреоїдного залишку можуть бути використані для розроблення підходів до створення та стандартизації клінічних протоколів лікування пацієнтів з патологією щитоподібної залози методом кріоабляції.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані в науковій та медичній практиці як теоретичне підґрунтя для розробки та оптимізації режимів кріоабляції патологічно зміненої тканини щитоподібної залози, а також для читання курсів лекцій і проведення практичних занять для студентів вищих навчальних закладів медичного та біологічного профілю.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написані всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримані експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистична обробка й зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати й зроблені остаточні висновки.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [22, 23] у порівняльному вивченні результатів резекції та кріодеструкції частки щитоподібної залози у щурів з моделлю пропілтіоурацил-індукованої дифузної гіперплазії;
- у роботах [24, 25, 26, 27] у вивченні динаміки морфологічних показників щитоподібної залози у гіпертензивних щурів лінії SHR при тривалому введенні пропілтіоурацилу;
- у роботі [28] у проведенні порівняльної оцінки гістологічних характеристик тканини щитоподібної залози гіпертензивних та нормотензивних щурів після кріодеструкції;
- у роботах [29, 30, 31, 32] у порівняльному аналізі морфологічних характеристик щитоподібної залози, нирки, печінки, та біохімічних показників крові у нормо- та гіпертензивних щурів на фоні введення пропілтіоурацилу;
- у роботах [33, 34, 35] у порівняльному аналізі температурних змін у процесі кріовпливу на тканину щитоподібної залози в нормі та за умов пропілтіоурацил-індукованої дифузної гіперплазії та визначенні гістопатологічних змін у тканині після кріовпливу;
- у роботах [36, 37] у оцінці результатів кріодеструкції тканини ЩЗ після кріовпливу з наступним контактним нагріванням.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи були представлені на 43-й та 44-й щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології та медицині» (Харків, 2019; 2020 рр.); III Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2019 р.); VI з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремча, 2019 р.); щорічної конференції «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2020; 2021 рр.); конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI ст.» (Одеса, 2019); VI Міжнародному онкологічному форумі «Белые

ночи» (Санкт-Петербург, 2020); IX міжнародної науково-практичної конференції «Dynamics of the development of world science» (Ванкувер, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 16 робіт, з них 5 статей в спеціалізованих виданнях України (2 входить у міжнародну наукометричну базу Scopus), 1 стаття у іноземному виданні країни ЄС/ОЕСР, 10 тез у матеріалах науково-практичних конференцій та конгресів, в тому числі 2 у міжнародних.

Структура й обсяг роботи. Дисертація викладена на 166 сторінках друкованого тексту й складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали й методи, п'ять розділів результатів досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновки, список використаних джерел, додатки. Список використаних джерел включає 230 найменувань, розміщених на 29 сторінках. Робота проілюстрована 22 рисунками, 14 мікрофотографіями та 11 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патології щитоподібної залози, що супроводжуються артеріальною гіпертензією

Поширеність маніфестного гіпотиреозу у світі, за різними даними, становить 0,2–2 %, субклінічного — до 3 % у чоловіків та до 10 % у жінок, а в осіб старше 70 років сягає 13–14 % [38]. В Україні в останні роки нараховується близько 0,3% пацієнтів, які перебувають на офіційному медичному обліку за таким діагнозом [38].

Тиреотоксикоз є синдромом, наявність якого пов'язана з підвищеним вмістом тиреоїдних гормонів в крові. Він спостерігається при дифузному токсичному зобі (ДТЗ), багатовузловому токсичному зобі, тиротоксічної аденомі, аутоімунному тиреоїдиті, фолікулярному раку ЩЗ і його метастазах, деяких ятрогенних станах [39]. Частота найбільш поширеної форми гіпертиреозу – ДТЗ в середньому по Україні складає 80-83 випадки на 100 тисяч населення [3]. Субклінічний гіпертиреоз, який характеризується зниженим рівнем ТТГ при нормальному вмісті Т4 і Т3 та відсутності клінічних проявів, частіше зустрічається у пацієнтів старшого віку. Поширеність його у світі складає 0,6–2% в цілому, а у пацієнтів старше 70 років – до 15% [40].

Обидва порушення функції ЩЗ, як гіпо- так і гіпертиреоз, можуть збільшити ризик виникнення артеріальної гіпертензії [4, 5, 6].

Загальновідомо, що тироксин (Т4) синтезується шляхом йодування амінокислоти тирозину і окисного конденсації 2 молекул дийодтирозину з відщепленням аланіну [41]. Трийодтиронін (Т3) утворюється при окислювальному конденсації молекул монойодтирозину та дийодтирозину. Близько 70-80% тиреоїдних гормонів, що виробляються у ЩЗ, надходять у кров у формі Т4. В периферичних тканинах за допомогою селен-залежної монодейодинази Т4 конвертується у Т3, який й є біологічно активною формою тиреоїдних гормонів. Рецепторами гормонів щитоподібної

залози є внутрішньоклітинні ДНК-зв'язуючі білки, які функціонують як фактори транскрипції. Тиреоїдні гормони проникають у клітину через білки-переносники плазматичної мембрани, цілу низку яких було ідентифіковано за останні роки [42]. Потрапивши у ядро, гормони зв'язуються з рецептором, після чого комплекс гормон-рецептор взаємодіє зі специфічними послідовностями ДНК. В результаті зв'язування комплексу гормон-рецептор з ДНК відбувається модуляція експресії шляхом стимуляції або пригнічення транскрипції певних генів.

Біологічні ефекти тиреоїдних гормонів є різноманітними та можуть відрізнятися в залежності від органу [43], однак з високою долею вірогідності можна сказати, що всі клітини організму є для них мішенями. Ці гормони відіграють важливу роль як у регуляції поточного обміну речовин, так й мають глибокий вплив на тривалі фізіологічні процеси, такі як ембріональний розвиток, зростання та дозрівання органів та систем.

Гормони щитоподібної залози призводять до збільшення рівня основного метаболізму, що результується у збільшенні вироблення тепла внаслідок підвищення споживання кисню та гідролізу АТФ, а також безпосереднього впливу на адіпоцити [4, 44, 45]. Тиреоїдні гормони приймають участь у регуляції обміну ліпідів, посилюють окислення жирних кислот у багатьох тканинах [46, 47]. Концентрація ліпідів у плазмі крові зворотно корелює з рівнем гормонів щитоподібної залози [48, 49]. Гормони ЩЗ впливають на біохімічні та молекулярні механізми ліпідного гомеостазу, в результаті чого виникає явище дисліпідемії, яке в основному характеризується високими концентраціями в сироватці крові загальних ліпопротеїнів, холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїнів середньої щільності, аполіпопротеїнів А/В та нормальним або підвищеним рівнем ліпопротеїнів високої щільності [50].

Тиреоїдні гормони стимулюють майже всі аспекти вуглеводного обміну, включаючи посилення інсулінозалежного надходження глюкози в клітини та посилення глюконеогенезу та глікогенолізу [43, 51].

Нормальний рівень гормонів ЩЗ має важливе значення для розвитку мозку, кісток та органів чуття [52, 53, 54, 55]. Як знижена, так і підвищена концентрація гормонів щитоподібної залози призводить до зміни психічного стану. Репродуктивна функція залежить від нормального рівню гормону, тоді як гіпотиреоз асоціюється з безпліддям [56].

Гормони ЩЗ мають прямий і непрямий вплив на серцево-судинну систему (ССС). Загальні фізіологічні ефекти тиреоїдних гормонів на ССС: збільшення частоти серцевих скорочень, скорочувальної здатності серця та серцевого викиду, сприяння розширенню судин та посилення припливу крові до органів [4, 57]. Під впливом вільного Т3 розширюються артеріоли периферичного кровообігу, що призводить до падіння артеріального наповнення з наступною стимуляцією ангіотензин-альдостеронової системи та вивільненням реніну [58].

Відомо, що синдром артеріальної гіпертензії (АГ) зустрічається у кожного третього дорослого пацієнта [59]. Згідно з рекомендаціями з діагностики та лікування гіпертонічної хвороби, у кожного пацієнта з синдромом АГ потрібно на початку виключити вторинні причини підвищення артеріального тиску, а тільки потім виставляти діагноз «гіпертонічна хвороба». Наприклад, пацієнти з гіпертиреозом мають прискорений пульс, збільшену амплітуду пульсу та збільшений серцевий викид до 300%, що нагадує стан підвищеної адренергічної активності, але концентрація катехоламінів у сироватці крові є нормальною [6].

З іншого боку, згідно сучасних досліджень, порушення функції серцево-судинної системи розвивається у 6–16% пацієнтів з тиреотоксикозом [4].

Механізми патогенного впливу гіперпродукції тиреоїдних гормонів на ланки ССС є комплексними та включають цілу низку факторів. Основними мішенями такого впливу є кардіоміоцити та ендотеліоцити периферичних артерій [4]. Встановлено, що за умов тиреотоксикозу активується синтез

цими клітинами натрійуретичного пептиду, а також зростають рівні ендотеліну-1 та адреномедуліну [6, 58, 59].

Опосередкований вплив тиреоїдних гормонів полягає в тому, що вони чинять збудливу дію на симпатичний відділ вегетативної нервової системи [60], при цьому відбувається оборотне збільшення числа бета-1- та бета-2-адренорецепторів у міокарді і підвищується чутливість міокарда до дії адренергічних речовин [61].

Відомо, що при тиреотоксикозі жорсткість артерій є підвищеною [62]. Це відбувається внаслідок впливу T4 на гладенькі м'язи судин та клітини ендотелію [63]. Крім того, кальцій/кальмодулін-залежна кіназа IV (Calcium/Calmodulin-dependent kinase IV, CaMKIV), є однією з мішеней тиреоїдних гормонів. Вона відіграє важливу роль у регуляції артеріального тиску завдяки контролю активності ендотеліальної NO-синтази (eNOC) [64].

Надлишок T3 призводить до метаболічних та гемодинамічних змін: зростання швидкості метаболізму, підвищення скорочувальної активності шлуночків на фоні падіння системного судинного опору, збільшення серцевого викиду. Пацієнти з гіпертиреозом мають підвищений систолічний артеріальний тиск [4].

T3 знижує системний судинний опір за рахунок розширення резистивних артеріол шляхом релаксації судинних гладком'язових клітин [65], при цьому підвищується серцевий викид. В результаті зниження системного судинного опору відбувається зміна перфузії нирок, що, в свою чергу, стимулює ангіотензин-альдостеронову вісь, реабсорбцію натрію у нирках та підвищення об'єму циркулюючої плазми. Тиреоїдні гормони також стимулюють секрецію еритропоєтину, що веде до збільшення еритроцитарної маси [65]. Результатом цих ефектів є підвищення об'єму циркулюючої крові і подальше підвищення серцевого викиду [61, 65, 66].

Як встановлено, гемодинамічні зміни при тиреотоксикозі впливають не тільки на серцевий викид з лівого шлуночка, але й з правого, оскільки у

пацієнтів з хворобою Грейвса або вузловим зобом також діагностується легенева гіпертензія [67, 68].

У нещодавно опублікованому дослідженні Lillevang-Johansen зі співавт. встановлено зв'язок між тиреотоксикозом та виникненням серцево-судинних захворювань серед пацієнтів [69]. За даними, отриманими при обстеженні 275 тисяч осіб з тиреотоксикозом, встановлено, що при достатньому контролі рівню тиреоїдних гормонів ризик виникнення серцево-судинних патологій є низьким та навпаки. З цієї точки зору, особи з субклінічним гіпертиреозом є групою ризику розвитку захворювань ССС, оскільки суб'єктивно вони не мають причин контролювати рівні Т3 та Т4 [69]. Тривалий вплив субклінічного гіпертиреозу призводить до зміни морфології та функції серця. Функція лівого шлуночка у таких людей змінюється: систолічна функція посилюється, тоді як діастолічна функція погіршується. В свою чергу зниження релаксації міокарду призводить до збільшення маси лівого шлуночка, а також збільшення частоти серцевих скорочень та аритмій, зокрема фібриляції передсердь [70, 71]. При відсутності зміни ліпідного профілю плазми крові, функція ендотелію у таких індивідуумів є порушеною та присутня підвищена тромбогенність [72, 73].

Застосовуючи критерії ВООЗ для виявлення гіпертензії, Saito та співавт. виявили діастолічну гіпертензію, яка зустрічалася у 3 рази частіше у пацієнтів з маніфестним гіпотиреозом в порівнянні з особами того ж віку без розладів ЩЗ [74]. За іншими даними, прихована гіпертонія присутня у 15% хворих на гіпотиреоз [4]. Також дослідження виявили позитивну кореляцію субклінічного гіпотиреозу та гіпертонії у жінок, але не у чоловіків [75, 76, 77]. При цьому, підвищений артеріальний тиск у пацієнтів з маніфестним гіпотиреозом повертається до норми після заміщення гормонів щитоподібної залози, а при субклінічному – ні [78].

Гіпотиреоз як одна з найпоширеніших причин дисліпідемії напряду пов'язана з підвищеним ризиком розвитку атеросклеротичних серцево-судинних захворювань [79, 80]. Раніше було показано, що у пацієнтів з

гіпотиреозом, який розвився внаслідок тиреоїдектомії з приводу диференційованого раку щитоподібної залози, може спостерігатися підвищена жорсткість аорти та порушення діастолічної функції серця [4, 81]. Товщина *t. intima* та *t. media* сонної артерії значно вища у пацієнтів як з явним, так і з субклінічним гіпотиреозом порівняно з суб'єктами контрольної групи (норма) [82].

Попередні дослідження показали, що патогенез вторинної діастолічної гіпертензії за умов гіпотиреозу є пов'язаним з підвищеним периферичним судинним опором і низьким серцевим викидом. Патологія характеризується значними змінами об'єму, ініціюючи підвищення артеріального тиску за рахунок активації ренін-залежних механізмів [83].

Таким чином, у пацієнтів з патологічним тиреоїдним гормональним профілем та ускладненням у вигляді вторинної гіпертензії під час операції на щитовидній залозі інтраопераційна нестабільність гемодинаміки може бути фактором ризику не тільки кровотеч, але й ускладнень з боку ССС. Отже, проблема операційних втручань на ЩЗ у пацієнтів з ускладненням у вигляді вторинної гіпертензії є актуальною та потребує розробки спеціальних підходів до інтра- та післяопераційного моніторингу.

1.2. Сучасні підходи до лікування дифузної гіперплазії щитоподібної залози

Токсична дифузна гіперплазія щитоподібної залози без патологічних ознак аутоімунного захворювання є аутосомно-домінантним спадковим захворюванням [84]. Дефіцит йоду в раціоні також призводить до гіперплазії фолікулярних клітин ЩЗ та клінічних ознак зобу з гіпотиреозом. Хвороба Грейвса або дифузний токсичний зоб (ДТЗ) є найбільш поширеним системним аутоімунним захворюванням, яке характеризується присутністю у організмі аутоантитіл до ТТГ-рецепторів. Аутоантитіла активують ТТГ-рецептори, що призводить до гіперплазії ЩЗ та гіперпродукції та секреції тиреоїдних гормонів.

Загальноприйнятими є три основні методи лікування ДТЗ: консервативна терапія антитиреоїдними препаратами (АТП), лікування радіоактивним йодом (радіойодтерапія) і хірургічне втручання [85, 86]. Вибір методу залежить від зовнішніх чинників (рівень вмісту йоду у регіоні, чинні протоколи лікування у системі охорони здоров'я країни) і від особливостей кожного пацієнта (вік, тривалість захворювання, обсяг ЩЗ, супутні захворювання і тяжкість тиреотоксикозу). При цьому, вважається, що медикаментозне усунення тиреотоксикозу є бажаним перед використанням радіойодтерапії, бо у іншому випадку це може призвести до тиреотоксичного кризу [85]. Механізм цього явища полягає у масивному руйнуванні фолікулярного епітелію радіоактивними частинками та одночасному викиду у кров тиреоїдних гормонів.

Провідними АТП на теперішній час є похідні тіосечовини (тіонаміди), до складу яких входять метимазол, карбімазол (попередник метимазолу) і пропілтіоурацил [85, 86]. Тіонаміди пригнічують зв'язування йодтиронінів і, отже, зменшують біосинтез ТГ. Прийом АТП є переважною терапією в Європі, Азії та США [87, 88].

Сучасними рекомендаціями Європейської Асоціації щитоподібної залози (European Thyroid Association) є наступні [86]. Пацієнтів з нещодавно діагностованим ДТЗ слід лікувати АТП. Метимазол або карбімазол слід застосовувати кожній невагітній пацієнтці. Метимазол вводять протягом 12–18 місяців, а потім припиняють якщо рівень ТТГ і антитіл до ТТГ-рецепторів нормальний. У разі вагітності у першому триместрі переважно застосовується ПТУ, оскільки, метимазол може викликати вади розвитку плоду (вроджена аплазія шкіри, дефекти пупкового канатика, персистуюча вітрова протока, атрофія мозку, атрезії стравоходу, заднього проходу, шлунка, синдром Ді Джорді, транспозиція великих судин, атрезія хоан) [85, 89, 90]. Таким чином, ПТУ є кращим вибором у першому триместрі вагітності, після чого він має бути замінений на метимазол.

Перед початком терапії АТП при ДТЗ рекомендується провести повний загальний аналіз крові, біохімічний печінковий профіль, включаючи білірубін і трансамінази. Тривалість консервативного лікування становить щонайменше 12–18 місяців, потім зменшують дозу або зовсім припиняють у разі нормалізації рівнів ТТГ та аутоантитіл до ТТГ-рецепторів.

Відомо, що при консервативної терапії не завжди вдається добитися стійкого клінічного ефекту, а рецидив захворювання, за даними деяких авторів, може досягати 80% [85]. Мета-аналіз, опублікований у 2013 році [91], підтвердив високу частоту рецидивів після терапії АТП (52,7%) у порівнянні з радіойодтерапією (15%) або резекцією (10%), а також значну кількість побічних ефектів у цих препаратів (13%).

Таким чином, у багатьох рекомендаціях щодо лікування ДТГ за відсутності ремісії цього захворювання на тлі консервативної терапії протягом 18 місяців, повторний прийом тиреостатиків не рекомендується. У цих випадках постає питання про радіойодтерапію або хірургічне лікування. Застосування АТП за 8–10 днів до радіойодтерапії не пригнічує проникнення ^{131}J у ЩЗ та не зменшує його ефективність [85]. Терапія радіоактивним йодом є відносно простою, неінвазивною та вельми ефективною у лікуванні

ДТЗ. Іонізуюче випромінювання призводить до загибелі фолікулярних клітин ЩЗ в результаті пошкодження ДНК (через розрив молекулярних зв'язків або опосередковано шляхом утворення вільних радикалів). Функція та розмір ЩЗ нормалізується протягом 3–12 місяців після терапії у 50–90% пацієнтів [92, 93]. Частота гіпотиреозу становить 5–50% після першого року і прямо пропорційно пов'язана з дозою іонізуючого випромінювання.

За рекомендаціями Європейської Асоціації щитоподібної залози радіойодтерапію рекомендують пацієнтам з побічними ускладненнями або рецидивами після курсу АТП [86]. Якщо застосовуються АТП, їх слід призупинити приблизно за 1 тиждень до радіойодтерапії, щоб не знизити її ефективність. Для радіойодтерапії використовується фіксована доза, оскільки жоден розрахунок радіойодтерапевтичної дози не може забезпечити тривалий еутиреоз (тобто поки немає індивідуального підходу до кожного пацієнта).

Однак незважаючи на високу ефективність радіойодтерапії, у 17–20 % випадків після лікування розвивається рецидив тиреотоксикозу. Поясненням цього можуть бути дослідження Xing Y.Z. та співав. [94]. Через 1 рік після радіойодтерапії авторами не було виявлено значної залежності між частотою рецидивів тиреотоксикозу та типами функції ЩЗ (гіпер-, еу- або гіпотиреоз), віком, статтю, величиною 3-годинного поглинання ^{131}J або його дозою. Однак було встановлено, що показник успішності лікування залежить від величини 24-годинного поглинання ^{131}J . Високий рівень рецидивів виявився у пацієнтів із поганим 24-годинним поглинанням ^{131}J (нижче 46,31%).

У разі неефективності консервативної терапії АТП та радіойодтерапії проводиться хірургічне лікування [85]. Показаннями до хірургічного втручання є: 1) великий зоб (обсяг ЩЗ перевищує 45 мл); 2) часті рецидиви тиреотоксикозу; 3) злоякісність зоба; 4) алергічні та токсичні (лейкопенічні) реакції. За рекомендаціями Європейської Асоціації ЩЗ операція показана, коли є: реакція на тиреостатики, великий обсяг зобу, випадковий первинний

гіперпаратиреоз, підозра на злоякісні вузлики; або пацієнт бажає уникнути впливу радіойодтерапії чи відсутня можливість її проведення [86].

Оперативне втручання дозволяє швидко усунути тиреотоксикоз. Якщо хірургічне втручання є методом вибору при ДТЗ, кращим підходом є періототальна або тотальна тиреоїдектомія [95–99]. Це пов'язано з тим, що тотальна тиреоїдектомія несе такий же ризик ускладнень, як і двостороння субтотальна тиреоїдектомія, тоді як частота рецидивуючого гіпертиреозу при цьому є нижчою [100, 101]. Тотальна тиреоїдектомія повністю виключає можливість рецидиву захворювання, однак для підтримки еутиреїдного статусу пацієнту потрібна замісна гормональна терапія. Найчастішими ускладненнями оперативного лікування ДТЗ є стійкий гіпаратиреоз (1–10%), утворення келоїдного рубця (2,8%), параліч зворотного нерва (2%), дисфонія та утруднене дихання (13%) [85, 102]. За рекомендаціями Європейської Асоціації ЩЗ: якщо обрано хірургічне втручання, то «процедурою вибору» є тотальна тиреоїдектомія. Еутиреоз слід відновити за допомогою АТП до операції, щоб уникнути пери- або післяопераційного загострення на тиреотоксикоз. Післяопераційний ризик гіпокальціємії знижується за допомогою зменшення дефіциту вітаміну D в організмі. За 10 днів до операції рекомендується вводити розчин йодиду калію [86].

Єдиний підхід до вибору обсягу хірургічного втручання у пацієнтів з ДТЗ й досі залишається предметом обговорення. Можливо комбінація резекції основної маси тканини ЩЗ разом з кріохірургічним впливом знизить ризик розвитку післяопераційних ускладнень.

1.3. Сучасні підходи у клінічній кріохірургічній практиці

1.3.1. Загальні механізми кріоушкодження клітин

Як відомо, механізми пошкодження клітин при заморожуванні включають два основних фактори: механічне ушкодження клітин кристалами льоду та так званий «ефект розчину» [103]. Внесок обох механізмів залежить від швидкості охолодження-відтаювання, індивідуальних властивостей біологічного об'єкту та типу кріопротекторних речовин, які використовуються у процесі кріовпливу [104,105,106].

Зниження температури рідких біологічних систем нижче критичних значень спочатку приводить до затвердіння позаклітинної рідини. Залежно від швидкості охолодження і використання кріопротекторів в результаті кристалізації можуть утворюватися як крупнокрісталічні, так й дрібнокрісталічні структури льоду [104]. Зростання кристалів льоду за умов позаклітинної кристалізації веде до зниження концентрації рідкої фази води, тим самим збільшуючи осмолярність навколишнього розчину. Концентрування речовин у позаклітинному середовищі призводить до виходу води з клітин – дегідратації. Біологічні перебудови клітини, які розвиваються при цьому, отримали назву «ефект розчину». Ефект розчину включає ліотропний та хаотропний ефекти, які результуються у зміні в'язкості, рН та концентрацій іонів внутрішньоклітинного середовища, порушенні нативної конформації полімерних молекул (білків, нуклеїнових кислот), їх висолюванні, просторовому зближенню макромолекул та руйнуванні мембранних органел/плазматичної мембрани.

Взагалі, при заморожуванні клітин розвиваються відразу декілька процесів: зменшення клітинного об'єму, дезорганізація білків цитоскелету та мембрани клітини, формування літичних дефектів у органелах та плазматичній мембрані, механічне пошкодження плазматичної мембрани зовнішніми кристалами льоду. Результатом цього є проникнення позаклітинного середовища всередину клітини після відтаювання, набухання

клітини, урівноваження вмісту речовин всередині і поза клітиною та клітинний лізис [104].

Якщо швидкість охолодження є настільки високою, що вода через клітинну мембрану не встигла вийти у позаклітинне середовище, спостерігається внутрішньоклітинна кристалізація, яка веде до летального пошкодження клітинних органел. Ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації збільшується при значному переохолодженні системи, пошкодженні плазматичної мембрани клітини, а також при низькій проникності плазматичної мембрани клітин для води, що перешкоджає її дегідратації [104]. Плазматичні мембрани клітин можуть проявляти стійкість до повільно зростаючих кристалів льоду, але сильно пошкоджуються у разі вибухового росту кристалів, які іноді можуть пронизувати мембрани наскрізь.

При використанні досить високих швидкостей охолодження розвивається процес рекристалізації, який вносить додатковий внесок у кріоушкодження клітин. Спонтанна кристалізація відбувається ще на етапі охолодження, коли початкові кристалічні структури починають перебудовуватися і укрупнюватися. Індукована кристалізація відбувається на етапі відтаювання, коли незавершені структури льоду стають центрами перебудови та росту кристалів [107]. Крім того, на етапі відтаювання спостерігається надходження води з позаклітинного середовища до внутрішнього простору клітини, що веде до різкого її набухання та, при летальних пошкодженнях, розриву плазматичної мембрани [104, 105, 108].

Неодноразово було показано внесок вільнорадикальних процесів у пошкодження клітин при заморожуванні [109]. Одним з проявів вільнорадикальних процесів є розвиток перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), яке посилює пошкодження мембран та перехід клітин до летального стану. Одним з головних джерел вільних радикалів є електрон-транспортний ланцюг мітохондрій, при витоку електронів з якого утворюється супероксидний аніон. Він взаємодіє з ліпідами мембран, особливо з

залишками ненасичених жирних кислот, які входять до складу ліпідів. Це призводить до формування пероксид-радикалів, окислювання частини молекули ліпиду, порушення її структури, а в цілому до втрати функції і цілісності мембрани [104].

Емпірично встановлено, що для різних клітин оптимальна швидкість заморожування є неоднаковою. При цьому, для різних типів клітин вона може варіювати у великому діапазоні (від 0,1 °C/хв. до 3000 °C/хв.) [104]. Відповідно до двофакторної теорії кріоушкодження П. Мейзура, це пов'язано з домінуванням першого (ефект розчину) або другого (механічне ушкодження) факторів при заморожуванні об'єкта, який має певні фізико-хімічні та біологічні характеристики [103, 108]. При швидкостях, нижче оптимальних біологічні об'єкти занадто довго перебувають під впливом високої осмолярності середовища, яка може зростати у 20 разів, зміненого рН, в'язкості, іонної сили і т.п. Це створює «ефект розчину». При швидкостях охолодження вище оптимальної, підвищується ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, з огляду на те що клітини не встигають втратити достатню кількість води. Це результується у механічному пошкодженні клітини.

1.3.2. Основні принципи кріохірургії

Парадоксально, але фактори, які негативно впливають на виживаність клітин при кріоконсервуванні, є сприятливими для цілей кріохірургії. Отже, для ушкодження небажаної тканини та видалення її з організму використовуються максимально-пошкоджуючі режими кріовпливу.

На відміну від клітин, які піддають кріоконсервуванню у певних середовищах, при кріохірургії механізми пошкодження клітин у складі тканин в організмі є дещо іншими.

Зрозуміло, що серед цих механізмів залишається пряме пошкодження клітин, викликане утворенням кристалів льоду. Клітини, щільно упаковані в тканину, пошкоджуються кристалами льоду механічним шляхом. Крім того, вони відчують на собі ефект розчину, але у меншій мірі.

У період відтаювання виникає порушення мікроциркуляції тканини («судинний ефект») [110, 111]. Зміни судин після заморожування-розморожування включають набряк тканин, застій кровообігу та прогресуючий тромбоз, що призводить до ішемічного пошкодження клітин, та їх загибелі шляхом некрозу та апоптозу [110, 112, 113]. Після кріовпливу апоптотичні клітини виявляються переважно у периферійних зонах кріовпливу, де температура була недостатньо низька для прямого руйнування клітин. Наприклад, апоптотичні клітини карциноми товстої кишки людини були ідентифіковані після впливу помірних температур (-6... -36°C) [110].

На протязі багатьох років основними принципами кріохірургії є:

- швидке охолодження тканини;
- повільне відтаювання тканини (конвективне нагрівання);
- повторювання циклів заморожування-відтаювання.

Швидкість охолодження повинна бути якомога більшою, оскільки при цьому утворюється внутрішньоклітинний лід, що ушкоджує клітини. Як було встановлено, внутрішньоклітинна кристалізація відбувається при швидкості охолодження від 20 до 50 °C/хв [114, 115]. При цьому, індивідуальні властивості тканини, яку піддають охолодженню, можуть мати вплив на швидкість кристалоутворення. Наприклад, у тканинах з щільною упаковкою клітин нижча швидкість охолодження може привести до утворення внутрішньоклітинного льоду [116]. Витримка кріоаплікатору у тканині повинна бути достатньою, оскільки при цьому підвищується час для утворення внутрішньоклітинного льоду.

Отже для максимального розвитку пошкоджуючого ефекту під час кріохірургії для кожної тканини повинні бути встановлені наступні параметри: швидкість заморожування; цільова пошкоджуюча температура в осередку кріовпливу; тривалість експозиції кріоаплікатору; швидкість відігріву; кількість кріовпливів; інтервал часу між повторними кріовпливами.

В клінічній кріохірургічній практиці швидкість охолодження повинна бути високою, тому кріохірургічний зонд слід охолоджувати до якомога

низьких температур, що створює умови для розвитку достатньої швидкості заморожування [110]. Однак потрібно усвідомлювати, що завдяки процесам теплообміну у тканинах на відстані від кріоаплікатору швидкість охолодження буде знижуватися. У зв'язку з цим кріопошкодження тканин буде нерівномірним. Виділяють як мінімум три зони кріопошкодження: I - зона проморожування, температура в якій сягає цільових негативних температур; II - зона охолодження, в якій температура знижується до 0°C; III - зона гіпотермії, мінімальна температура якої не виходить за рамки позитивних температур [117, 118].

Враховуючи це, кріопошкодження клітин у різних зонах буде мати різну природу. Механічне пошкодження клітин кристалами льоду та хімічне внаслідок «ефекту розчину» приведе до негайної загибелі клітин першої зони шляхом некрозу. На периферії будуть спостерігатися відстрочені події, включаючи апоптоз клітин, ішемічні порушення внаслідок руйнування мікросудинного русла, набряк, запалення [117, 118].

Крім того, заморожування може стимулювати імунологічну систему. Вважається, що після кріохірургічного втручання імунна система стає сенсibiliзованою до зруйнованої тканини, отже залишки тканини (або метастази) здатні активувати імунну відповідь. Цей феномен отримав назву «кріоімунологічний ефект» [119].

Ефективна кріохірургічна техніка потребує створення достатньої температури у всіх зонах тканини, яку піддають деструкції. Вважається, що цільовою температурою при кріохірургії пухлин є температура від -40 °C до -50 °C [110, 111, 120]. Ряд експериментальних даних свідчить, що загибель клітин відбувається й при нижчих температурах (-20 °C) [120]. Наприклад, меланоцити та м'язові клітини є більш чутливими до заморожування [11, 120]. Однак пухлинні клітини, як правило, більш стійкі, отже руйнування клітин при температурах нижче -40°C може бути неповним. Оскільки завдяки теплообміну на периферії зони кріовпливу температура у тканині підвищується та не сягає цільових показників, постає питання, як уніфікувати

температурні показники на якомога більшій площі. У кріохірургічній практиці ця задача вирішується завдяки використанню декількох кріоаплікаторів, розташованих з перекриванням зон проморожування [121, 122].

Експериментально встановлено, що тривалість експозиції кріоаплікатору повинна бути 5 хв, щоб дати час для розвитку процесів утворення кристалів та ефекту рекристалізації [110]. Це особливо важливо для того, щоб на периферії зони кріовливу, де тканина утримується при температурі нижче цільової, підвищити ступінь кріоушкодження клітин. Однак оптимальний час експозиції – це показник, який потрібно емпірично встановлювати, оскільки він може бути досить специфічним для різних тканин. Наприклад, для клітин раку передміхурової залози людини використовували експозицію протягом 20 хв при -10°C [120].

Деструктивний ефект, який розвивається при відтаванні тканини, залежить від попередньої швидкості охолодження. Інтенсивність рекристалізаційних процесів тим більше, чим вище була швидкість охолодження на етапі заморожування, тобто чим більш термодинамічно нестабільна структура була отримана при заморожуванні. Зниження швидкості нагріву при цьому приводить до максимального росту кристалів льоду під час рекристалізації та посилює пошкодження тканини. Таким чином, одним з підходів сучасної кріохірургії є довільне відігрівання замороженої тканини [110]. Крім того, великі кристали льоду, які утворюються під час рекристалізації на етапі відігрівання, створюють деформацію зсуву, яка додатково порушує тканину.

У сучасній кріохірургії необхідність використання повторних циклів заморожування-відтавання є загальноновизнаною [110, 111, 120]. Повторний цикл приводить до більш швидкого і масивного охолодження об'єму тканини. Це пояснюється тим, що перший цикл заморожування-відтавання збільшує теплопровідність тканини за рахунок руйнування клітин. Таким чином, зона проморожування при повторному кріовпливі поширюється на

більшу відстань від кріоаплікатору. Вибір інтервалу часу між циклами є теж важливим. Довший час відтавання сприяє розвитку рекристалізації та залишає тканину в гіпотермічному стані, що дає час для порушення мікроциркуляції.

1.3.3. Кріохірургічна техніка

З метою створення зони низької температури у вогнищі патологічної тканини клінічна та експериментальна кріохірургія використовує декілька типів кріоаплікаторів (контактний, пенетраційний, розпилювання) та декілька типів хладагентів (рідкий азот, аргон, оксид азоту, гелій, кислород, вугільна кислота). Для кріоабляції використовуються газоподібні хладагенти (кріоаплікатори на основі ефекту Джоуля-Томпсона), рідкі хладагенти (інстиляція рідкого азоту або рідкого кислороду) та тверді (металевий кріоаплікатор) [113, 123, 124]. Усі кріохірургічні інструменти можна розділити на пасивні кріозонди, автономні кріозонди та кріозонди з подачею холодоагенту з окремій ємності. Зазвичай локалізація новоутворення, його форма, поширеність і ступінь інфільтрації підлеглих тканин визначають вибір кріоінструментів. Крім того, можливе проведення комбінованих підходів до кріодеструкції з одночасним використанням різних способів кріодеструкції або холодагентів.

Для заморожування легкодоступних органів і тканин на глибину до 5 мм найкраще використовувати пасивні кріоаплікатори з мідним сердечником [125]. Автономні кріозонди можуть використовуватися для заморожування органів і тканин об'ємом не більше 10-25 см³. При заморожуванні великого обсягу необхідно використовувати кріозонди з подачею теплоносія з окремій ємності [125].

Контактний спосіб з використанням пасивного кріоаплікатору полягає в тому, що кріовплив здійснюється наконечником металевого кріоаплікатора, прикладеним до поверхні тканини [123, 126]. За умов контактного кріовпливу обсяг замороженої тканини залежить від температури наконечника, його форми, площі його контакту з тканиною, часу експозиції

та притоку теплової енергії від навколишнього середовища [113, 123, 127]. Також контактний спосіб може бути здійснено з використання інстиляції рідкого азоту у порожнину, наприклад, при кріохірургії кісток [123].

Пенетраційний (черезшкірний) спосіб кріоабляції дуже активно поширюється у сучасній кріохірургії завдяки використанню апаратів на основі ефекту Джоуля-Томпсона.

Донедавна використання черезшкірної кріохірургії було обмежене, тому що кріозонди мали великий діаметр, оскільки потребували термоізоляції на всьому протязі лінії подачі холодагенту. Кріозонди з великим діаметром неможливо було застосовувати у зв'язку ризиком кровотечі. Нові кріоапарати на основі ефекту Джоуля-Томпсона уникають цієї проблеми. Особливо важливим є те, що розвиток ендоскопічної техніки дозволяє введення кріоаплікаторів черезшкірно під візуальним контролем. У кріоаплікаторах останнього покоління використовується аргон кімнатної температури, який подається через герметичні ізольовані зонди. При цьому за рахунок швидкого розширення газу (ефект Джоуля-Томпсона) спостерігається його охолодження до низьких температур. При використанні азоту у кріоаплікаторах цього типу на поверхні аплікатору досягається температура від -165°C до -195°C [11, 113]. Проте у клінічній практиці найбільш поширеними є JT-апарати, які використовують оксид азоту та аргон. Використання цих хладагентів не дає такої низької температури та великого об'єму проморожування, як при використанні рідкого азоту, але вони мають певні переваги. Вони не потребують вакуумної ізоляції на усьому протязі лінії подачі, тому кріозонди можуть бути невеликими у діаметрі, що дає можливість вільно використовувати їх для кріоабляції новоутворень будь-якої локалізації та розміру [11, 113]. При застосуванні апаратів цього типу великий об'єм проморожування тканини досягається використанням більшої кількості зондів.

Ультразвукова діагностика (УЗД), комп'ютерна томографія (КТ) та магнітно-резонансна томографія (МРТ) можуть бути використані для

моніторингу зони кріодеструкції та перевірки покриття тканини, яка підлягає видаленню. Отже тонкі кріозонди, які випускаються декількох розмірів, можна вводити в патологічні осередки через ендоскоп або через шкіру. КТ, МРТ або УЗД дають можливість безпосередньо контролювати формування зони проморожування (ice ball).

На сьогодні, черезшкірна кріоабляція – це найбільш застосовуваний метод у клінічній практиці. Він здійснюється під легкою седацією та місцевою анестезією. Кріозонди зазвичай вводять у вогнище ураження під контролем УЗД або КТ [128]. Кількість кріозондів залежить від розміру ураження, і для найкращого покриття часто використовують кілька зондів. У типовій процедурі кріоабляції виконується 10-хвилинне заморожування, 5-10-хвилинне розморожування та 10-хвилинне заморожування. Однак, потрібно відзначити, що для кріоабляції різних типів уражень розроблюються індивідуальні протоколи. Під час заморожування навколо зондів утворюється зона промороження, яку видно на УЗД, КТ та МРТ. Температура на зовнішній поверхні крижаного кулі становить 0 °С, при цьому загибель клітин надійно настає на глибині 3–5 мм біля краю. Під час процесу заморожування можна контролювати розмір та форму зони проморожування, щоб переконатися, що вона повністю покриває вогнище ураження та не знаходиться поблизу критичних структур [128].

Таким чином, клінічна кріохірургія є галуззю знань та вмінь, яка продовжує розвиватися та має неабиякі перспективи. Очікується, що черезшкірна ендоскопічна кріохірургія стане практичним і ефективним методом лікування новоутворень різних органів як самостійного методу, так і в якості доповнення до інших варіантів лікування онкологічних захворювань [129].

У експериментальній кріохірургії, яка проводиться на дрібних лабораторних тваринах, коли використання засобів ендоскопічної техніки є неможливим, найчастіше використовується кріодеструкція з використанням контактного способу пасивним металевим кріоаплікатором. Наприклад, Le

Pivert P. та співав. використовували 3-мм металевий кріоаплікатор для відтворення процесу кріоабляції клітин раку простати на мишах [130].

1.4. Використання кріохірургії у клінічній практиці

Протягом останнього десятиліття кріоабляція була успішно застосована при первинних та вторинних пухлинах легенів [131,132]. Кращі показники коефіцієнту виживання пацієнтів без прогресування захворювання показав протокол з використанням трьох циклів заморожування-відтавання [132]. Після кріоабляції новоутворень легенів спостерігається менший больовий синдром [133]. Найбільш поширеними ускладненнями при кріоабляції легенів є пневмоторакс, інфікування та гемоптизис, який частіше виникає при використанні декількох кріозондів [131]. Гемоптизис може тривати кілька днів або навіть тижнів після процедури.

Кріохірургія використовується для видалення первинних або метастатичних пухлин печінки за відсутності позапечінкових метастазів та хірургічно нерезектабельних захворювань/пухлин [134]. Хорошими показаннями для черезшкірної кріоабляції є пухлини діаметром менше 5 см або обмежений внутрішньопечінковий рецидив після попередніх резекцій печінки. Однак для пухлин, що займають понад 50% печінки, та ті, що мають діаметр більше 6 см, кріодеструкція не призначається [135]. У 2003 р. Хи та співав. повідомили про використання кріоабляції у 65 пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою. Однорічна виживаність пацієнтів складала 63%, з них ремісія настала у 78% пацієнтів, 10,8% померли через рецидив захворювання, а решта – від супутніх захворювань [136]. В іншому дослідженні, в яке були зараховані пацієнти з ГЦК ранніх стадій, було встановлено, що показники виживання 1, 2, 3 та 4 роки становили 81%, 62%, 48% та 44%, відповідно [137]. Ускладнення кріоабляції печінки включають кріошок, печінкову кровотечу, печінкову недостатність, печінковий абсцес [138]. Кріошок як ускладнення печінкової кріоабляції, включав різну ступінь ниркової недостатності, дисеміновану внутрішньосудинну коагуляцію та

респіраторний дистрес-синдром. Його поява часто трапляється, коли діаметр замороженої ділянки перевищує 6 см [138].

Нещодавно було показано, що кріохірургія може бути ефективним методом для покращення виживаності та якості життя пацієнтів з раком підшлункової залози [138, 139]. Наприклад, у клінічному дослідженні Хи і співав. черезшкірна кріохірургічна тактика з використанням аргонно-гелієвого кріозонду застосовувалась для лікування 49 пацієнтів з нерезектабельним раком підшлункової залози [140, 141]. Методика передбачала два цикли заморожування протягом 5 хв та розморожування протягом 10 хв. Побічні ефекти включали біль у верхній частині живота зі збільшенням рівня амілази в сироватці крові; гострий панкреатит; та внутрішньочеревну кровотечу. Однак у 27 пацієнтів спостерігалось зменшення болю на $\geq 50\%$, у 22 – на 50% зменшення споживання знеболюючих препаратів [141].

У багатоцентровому дослідженні 80 пацієнтам з дисплазією стравоходу (синдром Барретта) застосовували ендоскопічну кріотерапію кожні 2-3 місяці до зникнення жодних гістологічних проявів дисплазії [142]. Пацієнтів спостерігали впродовж 2 років. Повна ерадикація дисплазії була досягнута у 84% пацієнтів. Ці обнадійливі результати привели до висновку, що кріохірургічний метод може бути потенційним варіантом лікування раку стравоходу.

У багатоцентровому ретроспективному дослідженні 79 пацієнтів з неоперабельним раком стравоходу, були піддані кріоабляції рідким азотом для місцевого контролю пухлини [143,144]. З них 67% пацієнтів попередньо отримували фотодинамічну та хіміопроменеву терапію. Після кріохірургії стравоходу у 49 пацієнтів пухлини становили стадію T1, у 36 пацієнтів – стадію T2. Повна ремісія спостерігалася у 72,2% пацієнтів з пухлинами стадії T1 порівняно з 33% із стадією T2 [145].

Управління з контролю за продуктами та ліками США (FDA) у 2002 затвердило кріоабляцію як спосіб лікування фіброаденоми молочної залози [128]. Процедура проводиться під місцевою анестезією і дозволяє лікувати

множинні фіброаденоми за один сеанс. Дослідження показали, що понад 80% фіброаденоми зникають через 1 рік після кріоабляції [146].

В останнє десятиліття черезшкірна УЗД-керована кріоабляція успішно застосовується при лікуванні раку молочної залози [147–150]. Показанням для такої операції є пухлини <2 см у розмірі і відсутність метастазування. У роботі Lanza E. і співав. підведено підсумок лікування пухлин молочної залози шляхом кріоабляції [150]. Кріоабляцію в основному проводили під контролем ультразвуку, і в середньому використовували два кріозонди. Повний місцевий контроль пухлини відзначався у 73% пацієнтів (середнє спостереження 8 місяців). Серйозних ускладнень не відзначено. Косметичний результат був задовільним. Найкращі результати досягалися при невеликих (<15 мм) протокових пухлинах.

У 2016 році Альянс Американської колегії хірургів онкологів (ACOSOG) вніс кріоабляцію як ефективне лікування уніфокального раку протоку молочної залози із показником успішності повної абляції пухлини 92% [151]. Крім того, відзначалося, що для лікування раку молочної залози IV стадії кріоабляція є безпечною та ефективною процедурою для зменшення об'єму пухлини [152].

Кріохірургія є ефективним методом лікування локалізованих кісткових метастазів і як паліативна міра – при поширених метастазах [123, 128]. У кістках хребта та тазу використовується комбінація цементапластики та кріоабляції, що забезпечує полегшення болю та зменшує ризик патологічних переломів [153.]. Багаторічні спостереження свідчать зниження крововтрати, повнота руйнування пухлини, зменшення частоти рецидивів за умов використання кріохірургічного методу видалення пухлин кісток [123]. Андрианов В.Л. і співав. встановили, що при кріоабляції пухлини кістки в середньому крововтрата склала 100-150 мл, в основному, внаслідок кровотечі з м'яких тканин. В контрольній групі при резекції аналогічного ураження крововтрата досягала в середньому 750-950 мл [154]. При кріоабляції пухлин

кісток використовують інстиляцію рідкого азоту у порожнину кісток або кріозонди JT-апаратів [123, 128].

Кріоабляція виявилася безпечною та ефективною для місцевого контролю десмоїдних пухлин [155]. У літературі також є повідомлення про використання методу для лікування аневризматичних кіст кісток, гігантоклітинних пухлин, остеїдної остеоми, неосифікуючої фіброми [155-157]. Іншим потенційним напрямком кріоабляції є черезшкірний невроліз при синдромі фасетного суглоба та дегенеративні болі в хребті [157].

В останнє десятиліття кріоабляція широко використовуються для лікування карциноми нирки. Класичними показаннями для цього є супутні захворювання, що запобігають хірургічному втручанню, контралатеральний рецидив та спадкові передракові стани. Багаторічні результати (5–10 років) за допомогою цих методів показали онкологічний результат не гірше того, який спостерігається за умов хірургічного видалення, але з меншою кількістю ускладнень та меншим зниженням функції нирок [158, 159].

З 1996 року Американською урологічною асоціацією (AUA) кріоабляція була прийнята як терапевтичний варіант для лікування локалізованого раку передміхурової залози, а з 1999 року – затверджена як спосіб первинного лікування раку передміхурової залози [160]. В даний час кріоабляція є ефективним та малоінвазивним методом лікування раку передміхурової залози I стадії. Кріоабляція також може розглядатися в якості засобу для лікування місцевих рецидивів після променевої терапії [10]. Відповідно до рекомендацій урологічної асоціації потенційними кандидатами на кріохірургію передміхурової залози є пацієнти з високим хірургічним ризиком, з низьким ($PSA < 10$ нг/мл) або проміжним ($PSA > 10$ нг/мл) ризиком прогресування раку [160]. За даними Rodríguez S. та співав., загальна виживаність після кріохірургії первинного раку передміхурової залози досягла 94,4%. Ускладнення включали нетримання сечі у 5,6%, обструкцію сечовивідних шляхів у 1,9%, забруднення уретри у 5,6%,

гематурію у 1,9%, біль у промежині у 11,1% та простаторектальний свищ у 0,9%. Еректильна дисфункція була виявлена у 98,1%. [160].

Кріоабляція застосовується для лікування доброякісних поверхневих уражень, наприклад, актинічного кератозу [10]. Для лікування метастазів меланоми проводять кріоабляцію, щоб уповільнити швидкість поширення пухлини.

В роботі Сипитого В.І. та співав. було показано позитивний ефект використання кріохірургічних підходів з використанням ендоскопічної техніки при трансназально-трансфеноїдальній кріохірургії аденом гіпофізу [161]. Як було встановлено, метод кріодеструкції аденом гіпофізу дозволяє мінімізувати травматичність, максимально зберегти інтактні тканини, значно знизити ризик післяопераційних інфекційних ускладнень та ликвореї, а також поліпшити якість життя пацієнтів [162].

У клінічне дослідження, яке проводилося з травня 2005 року до жовтня 2009 року, були включені дорослі пацієнти з метастазами в наднирники, яких лікували шляхом кріоабляції [163]. У 92% пацієнтів був досягнутий контроль пухлини. Основним ускладненням був розвиток гіпертонічного кризу під час завершальної фази процедури кріоабляції або у післяопераційний період. Автори зробили висновок про те, що кріоабляція надниркових залоз може бути успішно здійснена, при цьому для зниження ризику гіпертонічного кризу є доцільним призначення α -блокаторів.

Хімічна або термічна деструкція вузлових утворень ЩЗ останнім часом стала широко застосовуватися як метод малоінвазивного втручання. На теперішній час доведено ефективність черезшкірної етанолової деструкції («етанолової склеротерапії») кістозних утворень ЩЗ [164]. Лазерна, радіочастотна і мікрохвильова деструкція широко застосовуються при лікуванні ДВУ ЩЗ в тому випадку, якщо протипоказано хірургічне втручання [165–167]. Кріодеструкція застосовується не настільки широко, проте вже показана перспективність цього методу в терапії ДВУ ЩЗ [168, 169].

У дослідження Nared M. та співав. було включено 80 учасників віком від 20 до 60 років, яким за допомогою УЗД діагностовано доброякісні вузлові утворення ЩЗ [170]. Учасники були розділені на дві групи: до групи 1 (контрольна група) входило 40 учасників, яких лікували конвенціональним методом; до групи 2 увійшло 40 учасників, яким лікування вузлів проводили шляхом кріоабляції. В результаті спостережень протягом 6 місяців була встановлена статистично значуща різниця між групами щодо розміру вузлів ($0,87 \pm 0,25$ см проти $0,67 \pm 0,21$ см, відповідно, $P < 0,001$). Середній відсоток зміни розміру вузлів у період від 0 до 6 місяця у контрольній групі становив $+12,50\%$, тоді як у групі з кріоабляцією $-25,0\%$, $P < 0,001$. Статистично значущих відмінностей у параметрах гормональної функції ЩЗ між обома групами не було встановлено. Автори зробили висновок, що кріоабляція призводить до зменшення розміру вузлів без істотного порушення функції ЩЗ.

Кріоабляція включена до керівництва, яке було опубліковано у 2015 році Американською асоціацією з лікування щитоподібної залози (ATA), як альтернативний метод лікування вузлів щитоподібної залози та диференційованого раку щитоподібної залози [171]. Відзначено, що термічна абляція (радіочастотна та кріоабляція) демонструють високу ефективність лікування окремих віддалених метастазів із відносно невеликою кількістю побічних ефектів і можуть розглядатися як альтернатива хірургічному втручанню при цих захворюваннях. Однак, на жаль, у літературі останніх десятиліть практично не зустрічається інформації про клінічне використання кріоабляції новоутворень ЩЗ. Отже це питання потребує вивчення як у експериментальних моделях, так й у клінічних випробуваннях.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини

Експерименти проводили з використанням самиць щурів ліній SHR та Вістар 6-місячного віку, які утримувалися у віварії ІПКіК НАН України. Оскільки лінія щурів SHR отримана шляхом селективного інбридингу щурів Вістар [21], останні використовувалися в якості нормотензивного контролю.

Експерименти були проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р) при дотриманні вимог Комітету з біоетики ІПКіК НАН України, узгоджених з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

2.2. Моделювання дифузної гіперплазії щитоподібної залози

Дифузну гіперплазію (ДГ) щитоподібної залози у щурів моделювали за методом Polychronakos С. та співавт. [172]. Для цього тварини мали вільний доступ до збалансованого сухого корму («Гора», Україна), а в питній воді їм давали 0,1%-й розчин пропілтіоурацилу (ПТУ, «Sigma», США). Інтактні щури обох ліній служили контролем. Щурів забивали на 17, 25, 30-31, 39, 47, 60 та 120 доби експерименту, органи (ЩЗ, печінку, нирки, селезінку) вилучали та використовували для приготування гітологічних зрізів.

2.3. Кріодеструкція щитоподібної залози

Кріодеструкцію проводили під загальною анестезією: 7,5 мг/кг маси тилетаміну гідрохлориду, 7,5 мг/кг маси золазепаму гідрохлориду (препарат «Золетіл», «Virbac», Франція), 20 мг/кг маси ксилазіну гідрохлориду (препарат «Седазін», «Biowet», Польща).

На передній поверхні ший тварин скальпелем виконували поздовжній розріз довжиною 2-2,5 см через шкіру, підшкірну клітковину і фасцію.

Розставивши краї розрізу тупими гачками, відсували підщелепні залози і оголювали грудинно-під'язикові м'язи (*mm. sternohyoidei*). Двома гострими очними пінцетами поділяли по серединній лінії грудинно-під'язикові м'язи, розводячи їх в сторони, оголюючи трахею та ЩЗ (рис. 2.1, а). Кріовплив проводили на ліву долю ЩЗ (рис. 2.1, б-в).

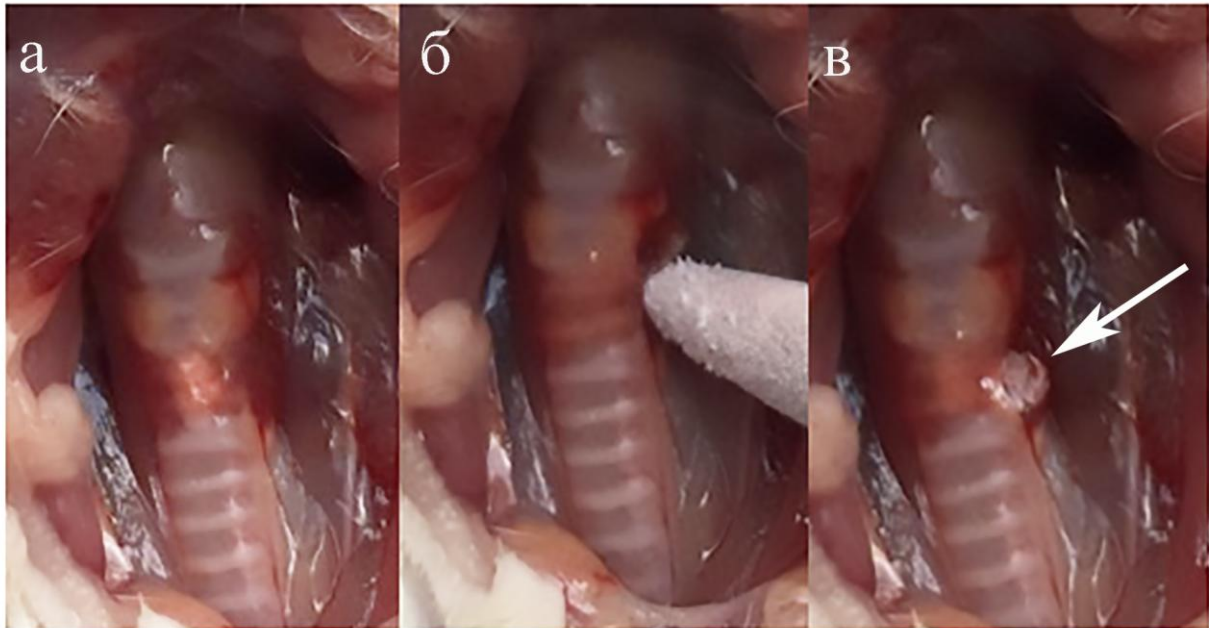


Рис. 2.1. Кріодеструкція лівої долі ЩЗ у щура. А – хірургічний доступ; Б – апплікатор в момент кріовпливу; В – тканина ЩЗ безпосередньо після кріовпливу. Стрілкою вказана зона проморожування тканини (iceball).

Кріовплив виконували при кімнатній температурі (22°C) за допомогою кріоаплікатору пасивного типу, виробленого з міді, з діаметром наконечника 1,5 мм і об'ємом охолоджувальної частини 21,99 см³. Для здійснення кріовпливу кріоаплікатор охолоджували до температури -196°C шляхом прямого занурення в рідкий азот і витримували там до повного припинення активного кипіння азоту. Після кріодеструкції тваринам накладали пошарово шви і повертали в умови віварію.

2.4. Нагрівання тканини ЩЗ після кріодеструкції

Після кріодеструкції здійснювали нагрівання тканини ЩЗ за двома способами:

1) неконтрольоване нагрівання (НН) – класичний спосіб конвективного нагрівання, при якому тканина пасивно відігрівалася за рахунок теплообміну з навколишнім середовищем;

2) активне контактне нагрівання (КН), до зони проморожування прикладали мідний аплікатор, нагрітий до температур 40, 50 і 60°C. Нагрівання припиняли, коли температура у зоні нагрівання досягала 28-30°C.

Потрібно відзначити, що температурні зміни у циклі «заморожування-нагрівання» контролювали за допомогою термопари. Після досягнення мінімальної температури, у той момент, коли температура починала підвищуватися, кріоаплікатор забирали, після чого здійснювали нагрівання першим або другим способом.

2.5. Контролювання процесів охолодження-нагрівання

Контроль процесів охолодження-нагрівання здійснювали методом контактної термометрії за допомогою мідь-константанових термопар (ТП). Показання ТП реєстрували за допомогою пристроїв «ОВЕН МВ-110» і «ОВЕН АС4» («Овен», Росія), підключених до персонального комп'ютера. Згідно технічних характеристик приладів похибка вимірювання температури становила $\pm 0,25\%$. Отримані дані обробляли за допомогою програм «Owen Process Vanager 1.2» і «Owen Report Wiewer 1.2» («Овен», Росія). За допомогою отриманих кривих визначали наступні показники:

1) $T_{\min}^n$ – мінімальне значення температури, що фіксується кожної з термопар (n - номер термопари, $n = 1, 2, 3$) при охолодженні зразка, після якого починається підвищення температури;

2) ΔT_n – максимальна різниця температур, що фіксуються кожної з термопар в процесі експерименту: температурний інтервал $T_0 \dots T_{\min}^n$, де T_0 –

температура зразка на початку процесу охолодження, $T_{\min}^n$ – мінімальне значення температури для кожної термопари (n - номер термопари, $n = 1, 2, 3$);

3) $\Delta\tau$ – довжина горизонтальної ділянки на термограмі охолодження, яка відповідає процесу кристалізації тканини в місці прикладення кріоаплікатору: $\Delta\tau = \tau_1 - \tau_0$, де τ_0 – час початку охолодження зразка, τ_1 – час закінчення кристалізації зразка (точка перегину кривої при температурі T_1 на термограмі охолодження);

4) $\Delta\tau_{\min}$ – час охолодження зразка до мінімальної температури: $\Delta\tau_{\min} = \tau_4 - \tau_0$, де τ_0 – час початку охолодження зразка, τ_4 – час, після закінчення якого була досягнута температура $T_{\min}$.

2.6. Отримання сироватки крові

Кров забирали шляхом декапітації тварин. Після утворення згустку чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно відокремлювали від стінок пробірки. Пробірки врівноважували і центрифугували зі швидкістю обертання 3000 об/хв на центрифугі ОПН-3 15 хвилин. Отриману сироватку швидко відбирали від формених елементів крові, переносили в мікропробірки, заморожували при -20°C і зберігали при цій температурі протягом місяця до проведення біохімічного дослідження.

2.7. Визначення рівню тиреоїдних гормонів та ТТГ

Кров щурів забирали на 30, 60 та 120 добу експерименту. Визначення рівню ТТГ, вільних Т3 і Т4 в сироватці крові тварин проводили методом ІФА з використанням тест-наборів ТТГ-ІФА-Бест, Т4 вільний-ІФА-Бест («Вектор-Бест», Росія), св Т3-ІФА («Хема», Росія) відповідно до інструкцій виробника.

2.8. Визначення рівню АЛТ та АСТ

Кров щурів забирали на 39 добу експерименту. Вимірювали АСТ і АЛТ з використанням тест-наборів виробництва «Erba Lachema» (Чехія), загальний і прямий білірубін, сечовину, креатинін - тест-наборів виробництва «High Technology, Inc» (США). Вимірювання показників проводили відповідно до інструкцій виробника.

2.9. Визначення рівню білірубіну

Кров щурів забирали на 39 добу експерименту. Вимірювали загальний і прямий білірубін за допомогою тест-наборів виробництва «High Technology, Inc» (США). Вимірювання показників проводили відповідно до інструкцій виробника.

2. 10. Визначення рівнів сечовини та креатиніну

Кров щурів забирали на 39 добу експерименту. Вимірювали рівні сечовини та, креатиніну за допомогою тест-наборів виробництва «High Technology, Inc» (США) відповідно до інструкцій виробника.

2.11. Забарвлення гематоксилином і еозином

Для гістологічних досліджень органи фіксували в 10%-му нейтральному формаліні, після чого їх піддавали гістологічній проводці. Готували гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм і фарбували їх гематоксилином і еозином за стандартною методикою [173].

2.12. Світлова мікроскопія

Дослідження гістологічних зрізів та мікрофотозйомку проводили з використанням світлового мікроскопу («AmScope», Китай) з цифровою камерою TCC-5.0ICE (5 mPx, «Tucsen», Китай). Для кількісної оцінки за допомогою програми для обробки зображень AxioVision Rel 4.7 розраховували відносну площу позитивного мічення як відношення сумарної

площі забарвлених структур (в мкм^2) до стандартної площі зрізу (в мкм^2), помноженому на 100 %.

2.13. Визначення морфологічних показників тканин різних органів

Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програми «AxioVisionRel. 4.8» (CarlZeiss, Німеччина). Підрахунки проводили на 9-10 зрізах кожного органу, накопичували не менше 100 вимірів кожного морфологічного показника.

В гістологічних препаратах ЩЗ вимірювали:

- середню висоту фолікулярного епітелію (ВФЕ) (у мкм);
- середню площу фолікулів (у мкм^2);
- ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) тироцитів;
- відношення кількості тироцитів до фібробластів (Т/ФБ) на 50 мкм^2 площі зрізу;
- середню кількість фолікулів з сосочковими структурами на поле зору (ПЗ) площею $0,15 \text{ мм}^2$;
- середню кількість С-клітин (у проміле на 1000 фолікулярних клітин) на ПЗ площею $0,04 \text{ мм}^2$;
- середню кількість інтерфолікулярних острівців (ІФО) на ПЗ площею $0,04 \text{ мм}^2$;
- середню кількість фолікулів неправильної форми (ФНФ), до яких відносили фолікули зі складками, фрагментацією, перетяжками, на ПЗ площею $0,04 \text{ мм}^2$.

В гістологічних препаратах нирок вимірювали:

- середню площу ниркових тілець ($S1$, мкм^2);
- середню площу капілярних клубочків ($S2$, мкм^2);
- середню площу сечового простору ($S3$, мкм^2);
- середню висоту епітелію парієтального листка капсули

Шумлянського-Боумена.

В гістологічних препаратах печінки вимірювали велику і малу вісі центральної вени печінкових часточок для визначення її середньої площі (S_{cv} , мкм^2) за формулою площі еліпса:

$S_{cv} = \pi ab$, де a - велика піввісь, b - мала піввісь центральної вени.

В гістологічних зрізах селезінки визначали середній діаметр трабекулярних артерій (мкм) та середню площу синусоїдних капілярів (мкм^2).

В гістологічних зрізах серця вимірювали середню площу цитоплазми кардіоміоцитів (S_{cc}), середню площу ядра кардіоміоцитів (S_{nc}), ядерно-цитоплазматическое відношення кардіоміоцитів, щільність кардіоміоцитів як їх кількість на $0,05 \text{ мм}^2$ (D_c), щільність фібробластів як їх кількість на $0,05 \text{ мм}^2$ (D_f), середню площу просвіту вен (S_v).

2.14. Визначення площі зони фіброзу, сформованого у місці кріодеструкції ЩЗ

Площу зони фіброзу (S_f), сформованої у місці кріовпливу, вимірювали на різні терміни після кріодеструкції тканини ЩЗ. Для цього з кожного зразка ЩЗ готували серійні зрізи. Визначали S_f у кожному зрізі зразка ЩЗ. Після цього S_f для кожного зразка ранжирували від мінімальної до максимальної. Відповідно до 3-х зон, які формуються в тканині після кріовпливу [117], отримані показники S_f ранжирували від мінімальної до максимальної та порівну поділяли на 3 групи: мінімальну ($S_{f_{\min}}$), середню ($S_{f_{\text{med}}}$) та максимальну ($S_{f_{\max}}$) площу фіброзу. Вираховували середні показники $S_{f_{\min}}$, $S_{f_{\text{med}}}$ та $S_{f_{\max}}$ для кожної групи тварин.

2.15. Імуногістохімічне визначення маркера проліферації Ki-67

Ki-67 є регуляторним білком, який експресується у клітині специфічно у момент вступу клітини в мітотичний цикл (фази G1, S, G2 та M) [174]. Визначення експресії Ki-67 проводили на депарафінованих зрізах ЩЗ із попереднім демаскуванням антигенів у цитратному буфері (pH=6,0) за допомогою витримування у мікрохвильової печі («LG Electronics», Південна Корея) протягом 10 хв. Використовували кролячі моноклональні антитіла до Ki-67 (клон SP6, Spring Bioscience, США) у розведенні 1:100. Для візуалізації імуногістохімічного забарвлення в якості хромогену використовувався DAB (діамінобензидін). Контролем неспецифічного зв'язування антитіл були зразки, які замість розчину антитіл до Ki-67 інкубували у фосфатно-сольовому буфері. Коричневе забарвлення ядер оцінювали як Ki-67-позитивне мічення клітини. Для кількісної оцінки використовували програму для обробки зображень AxioVision Rel 4.7. Підраховували кількість позитивно-забарвлених клітин на 100 клітин фолікулярного епітелію.

2.16. Резекція щитоподібної залози

Резекцію ЩЗ проводили за методом [175]. На передній поверхні ший тварин скальпелем виконували поздовжній розріз довжиною 2-2,5 см через шкіру, підшкірну клітковину і фасцію. Розставивши краї розрізу тупими гачками, відсували підщелепні залози і оголювали грудинно-під'язикові м'язи (mm. sternohyoidei). Двома гострими очними пінцетами поділяли по серединній лінії грудинно-під'язикові м'язи, розводячи їх в сторони, оголюючи трахею та ЩЗ. Ретроградно піднімаючи ліву частку ЩЗ, відсепаровували її спочатку від трахеї (Рис. 2.2) і звільняли без пошкоджено поворотний гортанний нерв (n. laryngeus recurrens), відсуваючи його до трахеї. Після цього ліву частку ЩЗ відокремлювали від грудинно-щитовидного м'яза (m. sternothyreoideus), та проводили резекцію. При цьому перешийок залози залишали інтактним, а тиреоїдний залишок становив 1/5 лівої частки.

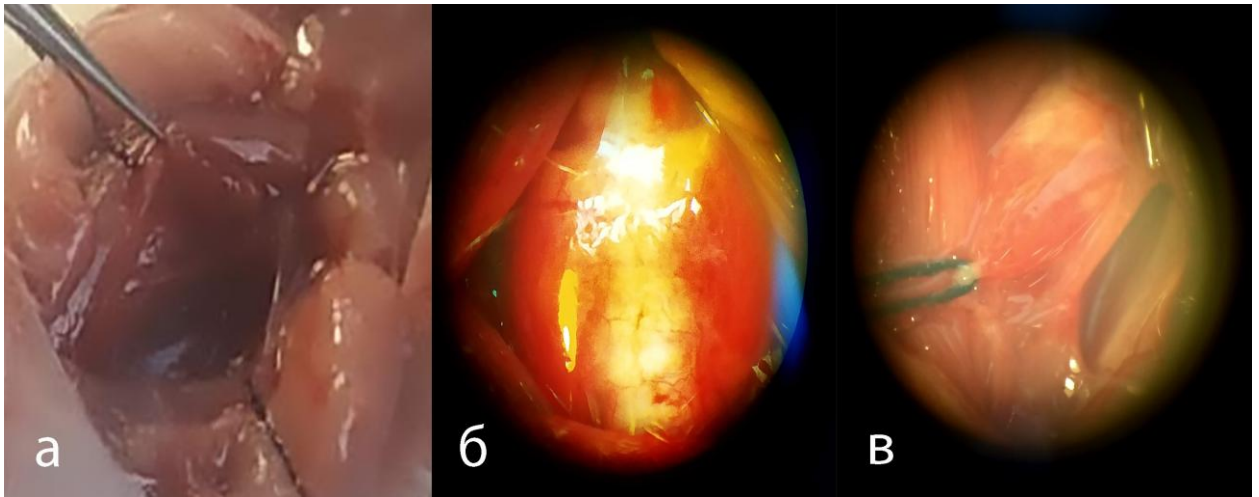


Рис. 2.2. Резекція лівої частки ЩЗ у щура. А – хірургічний доступ; Б – ЩЗ у полі зору мікроскопу; В – відсепаровування ЩЗ від трахеї ретроградним способом.

Для контролю гемостазу використовували препарат «Гемотран» (50 мг/мл, Україна) і тугу тампонаду. Обережно промивали порожнину операції 0,9%-м розчином NaCl з антибіотиками. Після цього повертали на колишнє місце та фіксували грудинно-під'язикові м'язи, підщелепні залози. Накладали шви на шкіру і оброблювали її 3%-м розчином йоду.

У деяких експериментах використовували хібнооперованих тварин у якості контролю, при цьому їм було здійснено усі вищезазначені етапи хірургічного втручання окрім резекції ЩЗ.

2.17. Групи експериментальних тварин

В експериментах було використано групи експериментальних тварин, представлені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Кількість та лінія тварин, використаних у експериментах.

№	Умови експерименту	Вістар	SHR
1.	Інтактні	20	28
2.	Хібнооперовані	12	12
3.	ПТУ-індукована гіперплазія ЩЗ	28	28
4.	Кріодеструкція інтактної ЩЗ	12	12
5.	Кріодеструкція ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією	16	38
6.	Резекція ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією	-	14
7.	Кріодеструкція ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією та КН	-	18

2.18. Статистична обробка результатів

Для статистичного аналізу даних використовували програми Statistica 10 («StatSoft», США) та Excel. Нормальність розподілу визначали за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлкі. Результати експериментів представлені у вигляді середнього значення $\pm$ стандартне відхилення для даних з нормальним розподілом. В решті випадків результати представлені у вигляді медіана (Me) $\pm$ інтерквартильний розмах (IP) або Me (Q1; Q3), де Q1 – 1-й квартиль; Q3 – 3-й квартиль. IP визначали як різницю між квартилями 3 і 1 порядку. Статистичну значимість відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні (для усіх даних) або t-критерію Стьюдента (для даних з нормальним розподілом). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ПРОПІЛТІОУРАЦИЛУ НА ЩИТОПОДІБНУ ЗАЛОЗУ, ПЕЧІНКУ, НИРКИ, СЕРЦЕ ТА СЕЛЕЗІНКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR ТА ВІСТАР

3.1. Вплив ПТУ на морфологічні показники щитоподібної залози щурів лінії SHR та Вістар

Будь-яка дисфункція ЩЗ, яка супроводжується гипо- або гіпертиреозом, підвищує ризик виникнення артеріальної гіпертензії (АГ) [10]. Це потрібно враховувати під час моніторингу, амбулаторного та стаціонарного лікування таких пацієнтів, а також за умов хірургічного втручання на ЩЗ. Для визначення ризиків, які існують з боку реактивності ССС при хірургічному втручанні на ЩЗ, зокрема, кріодеструкції, актуальною є розробка експериментальних моделей на тваринах, що поєднують обидві патології.

Спонтанно-гіпертензивні щури лінії SHR широко використовуються для вивчення цілого ряду патологій [18, 19], а також є загальноприйнятною моделлю стану АГ [17, 21]. Як було встановлено раніше, патофізіологічні та патоморфологічні ознаки АГ у щурів лінії SHR найбільш близькі до таких у людини [20, 21]. При цьому, підвищені показники систолічного тиску у тварин починають розвиватися з 5-6 тижнів, остаточно стабілізуючись на рівні в 1,6 рази вище нормального у 4,5 місяця. На відміну від щурів Вістар у щурів лінії SHR спостерігається підвищення артеріального тиску, збільшення співвідношення маси міокарда до маси тіла, збільшення розміру міоцитів та їхньої кількості, фіброз, ремоделювання коронарних артерій, порушення окисного фосфорилування в мітохондріях, гіперактивація ангіотензин-альдостеронової системи [17, 176, 177].

Пропілтіоурацил (ПТУ) є одним з препаратів тиреостатичної дії. На сьогодні, ПТУ-індукована модель є загальноприйнятною при вивченні патоморфологічних характеристик ЩЗ на нелінійних щурах [172, 178–180]. Проте у науковій літературі досі не існує інформації про моделювання ПТУ-індукованої дифузної гіперплазії на щурах лінії SHR. Отже на першому етапі

роботи було необхідним порівняти гістопатологічні зміни після введення ПТУ у ЩЗ щурів ліній SHR та Вістар для оцінки адекватності обраної моделі.

За візуальною оцінкою, після застосування ПТУ впродовж місяцю у щурів обох ліній збільшувався розмір ЩЗ (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Зміна розміру ЩЗ під дією 0,1% ПТУ інтактного щура лінії SHR (1) і щура тієї ж лінії на 39 добу введення ПТУ (2).

Середня маса ЩЗ інтактних щурів обох ліній становила приблизно 20 мг. Після аплікації ПТУ вже на 17 добу маса ЩЗ збільшувалася в 3,2 (SHR) та 3,9 (Вістар) разів (Рис. 3.2). Наприкінці терміну експерименту (47 доба прийому ПТУ) маса ЩЗ щурів зростала в 5,3 (SHR) та 5,1 (Вістар) разів.

Гістологічні характеристики зразків ЩЗ інтактних тварин обох ліній були схожі. ЩЗ оточена сполучнотканинною капсулою, відгалуження якої проникають всередину органу та поділяють його на дольки. По міждольковим прошкам сполучної тканини проходять кровоносні та лімфатичні судини, нерви. Дольки ЩЗ складаються з округлих та овальних фолікулів різних розмірів щільно розташованих один біля одного (рис. 3.3).

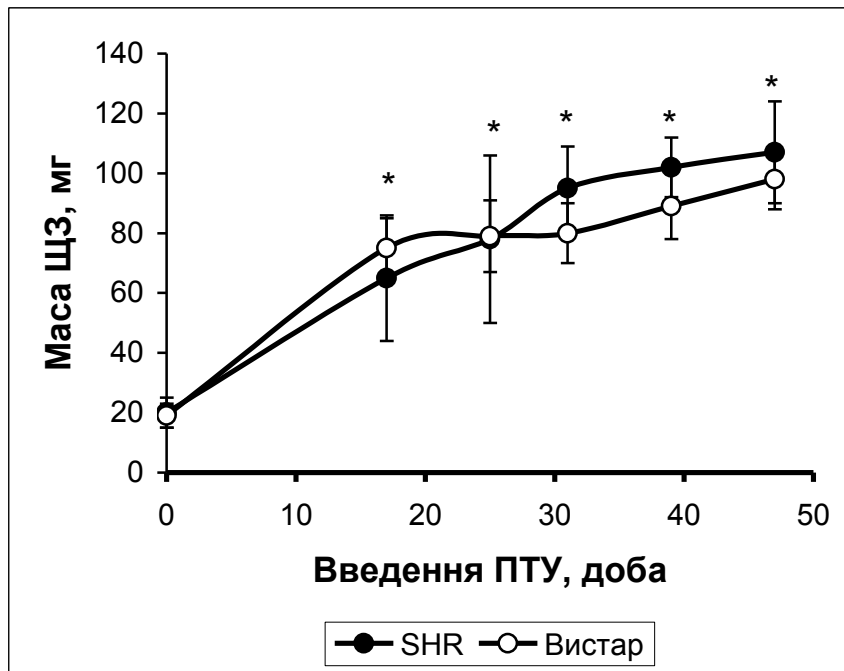


Рис. 3.2. Зміна маси ЩЗ у щурів обох ліній на різні терміни введення ПТУ; * - відмінності значущі в порівнянні з першою добою, $p < 0,05$.

Між фолікулам у тонких прошарках сполучної інтерстиціальної тканини спостерігаються кровоносні капіляри. Фолікули містять один шар епітеліальних клітин. Округлі ядра фолікулярних клітин лежать ближче до базальної мембрани. Форма клітин варіює від кубічної (частіше) до пласкій. Порожнина фолікулів заповнена ацидофільним колоїдом, іноді з вакуолями резорбції.

У експериментальних щурів обох груп на 17 добу від початку прийому ПТУ виявлені зміни в тканині ЩЗ. У щурів лінії SHR спостерігалися фолікули в основному без колоїдного вмісту, вистелені призматичним епітелієм. Часто присутні фолікулярні клітини, що заповнюють просвіт фолікулу (рис. 3.4, а). У деяких фолікулах виявляється кілька шарів клітин.

У щурів Вистар в тканині ЩЗ на 17 добу встановлено присутність фолікулів змінного розміру, частково або повністю заповнених колоїдом (рис. 3.4, б). Більшість фолікулів вистелені кубічним епітелієм; деякі - призматичним епітелієм. Зрідка спостерігаються фолікули з багат шаровим

епітелієм, а також великі фолікули з розвитком сосочкової проліферації епітелію. В стромі органу виявляються ознаки венозної гіперемії.

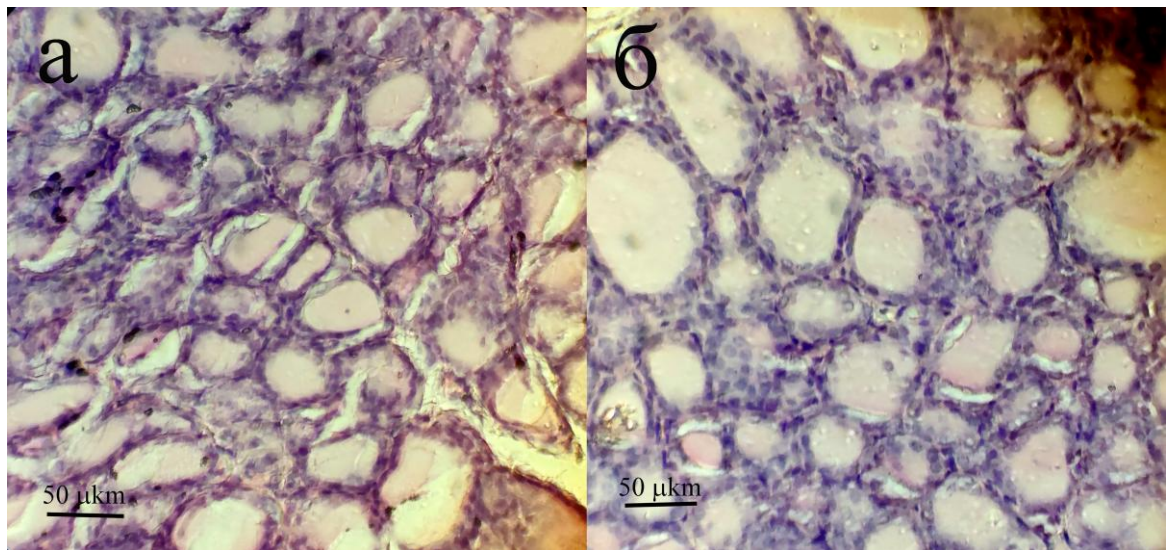


Рис. 3.3. Мікрофотографії зрізів ЩЗ інтактних щурів Вістар (а) та SHR (б).

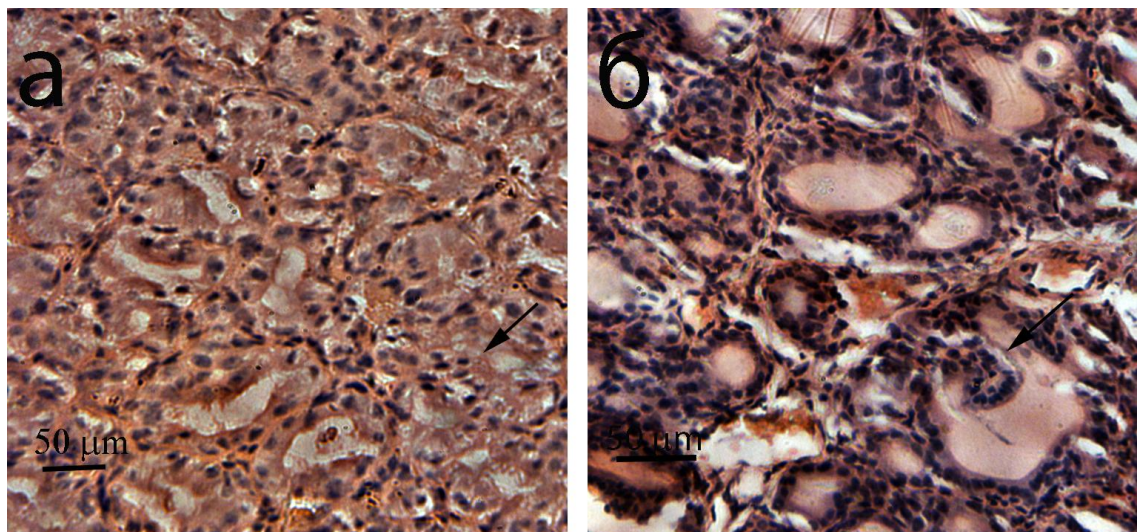


Рис. 3.4. Мікрофотографії зрізів ЩЗ щурів SHR (а) та Вістар (б) на 17 добу введення ПТУ. Стрілкою вказано багатошаровість фолікулярного епітелію (а) та фолікул з розвитком сосочкової проліферації епітелію (б).

На 31 добу в обох групах спостерігається подібна картина (рис. 3.5), яка характеризується інтенсивною інтрафолікулярною гіперплазією епітелію. У ЩЗ переважають дрібні фолікули без колоїду, вистелені призматичним епітелієм, який практично повністю заповнює їх просвіт. В стромі ЩЗ спостерігаються множинні розширені застійні кровоносні капіляри. На 39 та 47 добу в ЩЗ тварин обох груп продовжували визначатися вищеописані ознаки гіперплазії, однак застійні явища в кровоносних судинах стромы були менш вираженими, ніж на попередніх термінах спостереження (рис. 3.6).

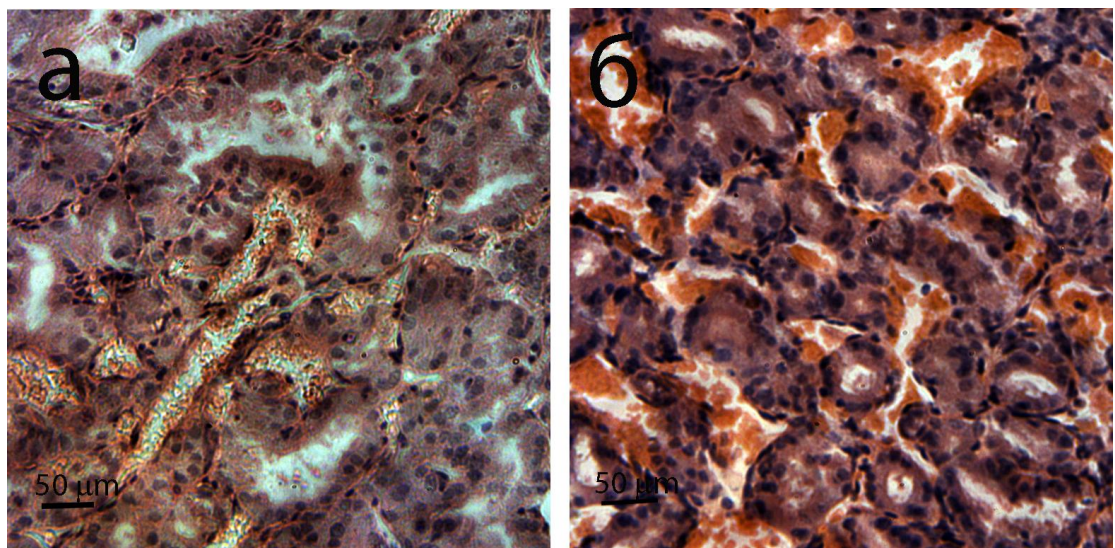


Рис. 3.5. Мікрофотографії зрізів ЩЗ щурів SHR (а) та Вістар (б) на 31 добу введення ПТУ.

Кількісна динаміка середнього показника висоти фолікулярного епітелію (ВФЕ) під час введення ПТУ щурам лінії SHR представлені на рисунку 3.7. Помітно, що показник нерівномірно змінюється під час прийому ПТУ: на 17 добу спостерігається збільшення ВФЕ приблизно у 2 рази, на 25 добу – зменшення до вихідних значень, а починаючи з 31 доби відбувається стабілізація показника на рівні 14–16 мкм, що є у 1,5 – 1,7 рази більше, ніж до прийому ПТУ. Зниження показника на 25 добу може свідчити про активно проліферацію епітеліальних фолікулярних клітин саме у цей термін.

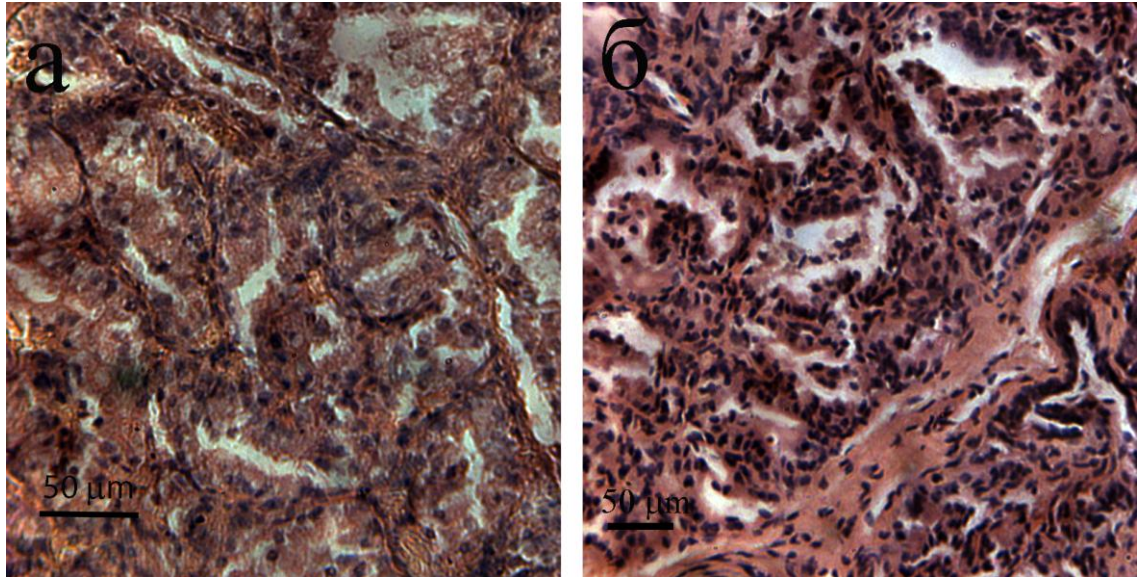


Рис. 3.6. Мікрофотографії зрізів ЩЗ щурів SHR (а) та Вістар (б) на 47 добу введення ПТУ.

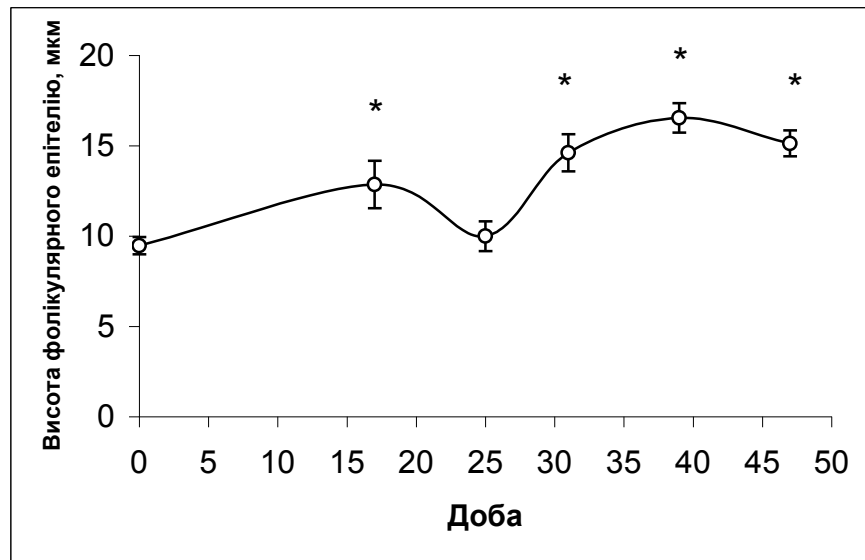


Рис. 3.7. Середня висота фолікулярного епітелію ЩЗ щурів лінії SHR на різних термінах введення ПТУ. Примітка: * – показник значуще відрізняється по відношенню до 0 доби, $p < 0,05$.

Збільшення показників ВФЕ в порівнянні з вихідними показниками спостерігалось й у щурів Вістар (таблиця 3.1). При цьому, у щурів лінії SHR показники ВФЕ і кількості фолікулів неправильної форми (ФНФ), до яких

відносили фолікули з інтрафолікулярними сосочковими структурами, були статистично вище в порівнянні з щурами Вістар.

Таблиця 3.1. Морфометричні показники ЩЗ щурів SHR та Вістар на 0 та 39 добу введення 0,1% ПТУ.

Показатели	SHR 0 доба		Вістар 0 доба		SHR 39 доба		Вістар 39 доба	
	М	IP	М	IP	М	IP	М	IP
ВФЕ, мкм	9,4	1,4	9,1	1,6	16,5 #*	4,7	12, 3 #	2,6
ФНФ	-	-	-	-	8,0 *	3,0	4,0	4,0

Примітка: М - медіана; IP - інтерквартильний розмах; КПФ - кількість патологічних фолікулів з сосочковими структурами на 0,15 мм²; # - показник тварин відповідної групи значуще різниться в порівнянні з нульовою добою, $p < 0,05$; * - показник значуще різниться між щурами лінії SHR та Вістар, $p < 0,05$.

Введення ПТУ приводило до змін середньої площі фолікулів у тканині ЩЗ (рис. 3.8). Площа фолікулів статистично значуще підвищувалася на 17 добу, потім відбувалася стабілізація показника на рівні, який на $9,1 \pm 2,3\%$ перевищував вихідні значення.

Зміна ядерно-цитоплазматичного відношення (ЯЦВ) тироцитів є гістологічною ознакою гіперпластичних процесів ЩЗ [181]. В нашому експерименті на фоні введення ПТУ цей показник теж зазнавав певної динаміки (рис. 3.9). Від початку експерименту він декілька зменшувався (з $0,28 \pm 0,05$ до $0,25 \pm 0,08$), після чого з 25 доби підвищувався та залишався до кінця терміну спостереження у межах від $0,39 \pm 0,10$ до $0,46 \pm 0,15$ ($p < 0,05$). На

47 добу прийому 0,1% ПТУ ЯЦВ тироцитів у щурів лінії SHR підвищувалося в порівнянні з вихідним показником на $39 \pm 5,4\%$.

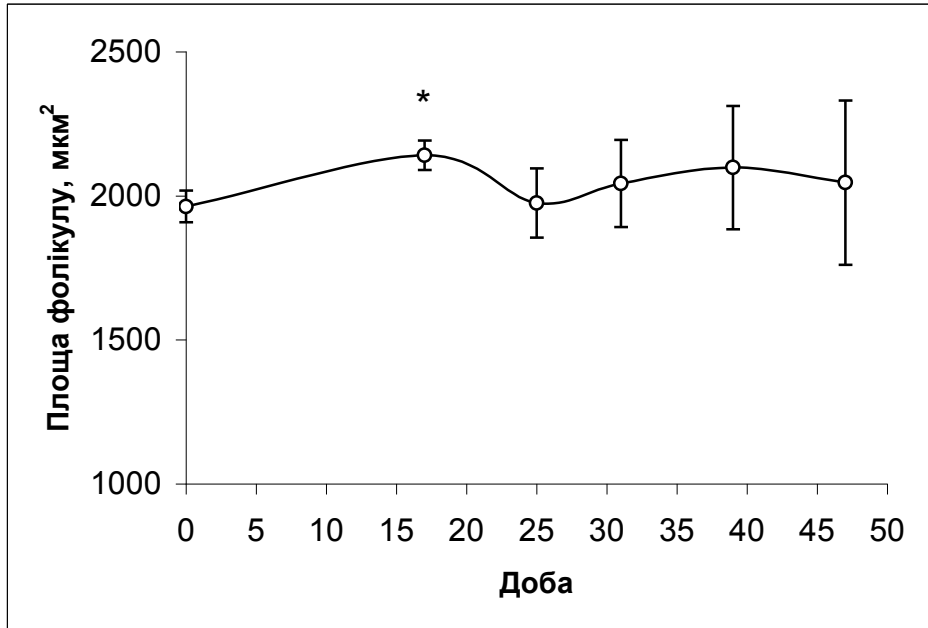


Рис. 3.8. Середня площа фолікулів ЩЗ щурів лінії SHR на різних термінах введення ПТУ. Примітка: * – показник значуще відрізняється по відношенню до 0 доби, $p < 0,05$.

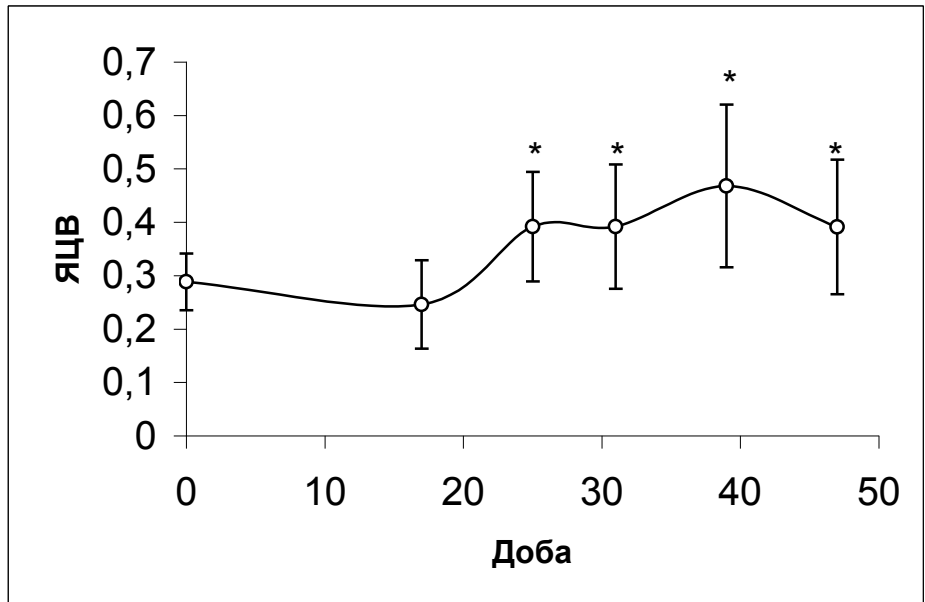


Рис. 3.9. ЯЦВ тироцитів щурів лінії SHR на різних термінах введення ПТУ. Примітка: * – показник значуще відрізняється по відношенню до 0 доби, $p < 0,05$.

Відомо, що паракринна стимуляція у патологічно зміненій тканині ЩЗ може стимулювати проліферативні процеси у стромі органу за участі ростових факторів та хемокінів [182]. Зважаючи на це, нами було вивчено співвідношення тироцит/фібробласт (Т/ФБ) у тканині ЩЗ щурів лінії SHR при введенні ПТУ (рис. 3.10). На всьому терміні спостереження встановлено поступове зменшення показника, що свідчило про активацію проліферації фібробластів. Відношення Т/ФБ на початку експерименту дорівнювало $2,87 \pm 1,23$, тоді як на 47 добу воно складало $0,54 \pm 0,29$ ($p < 0,05$).

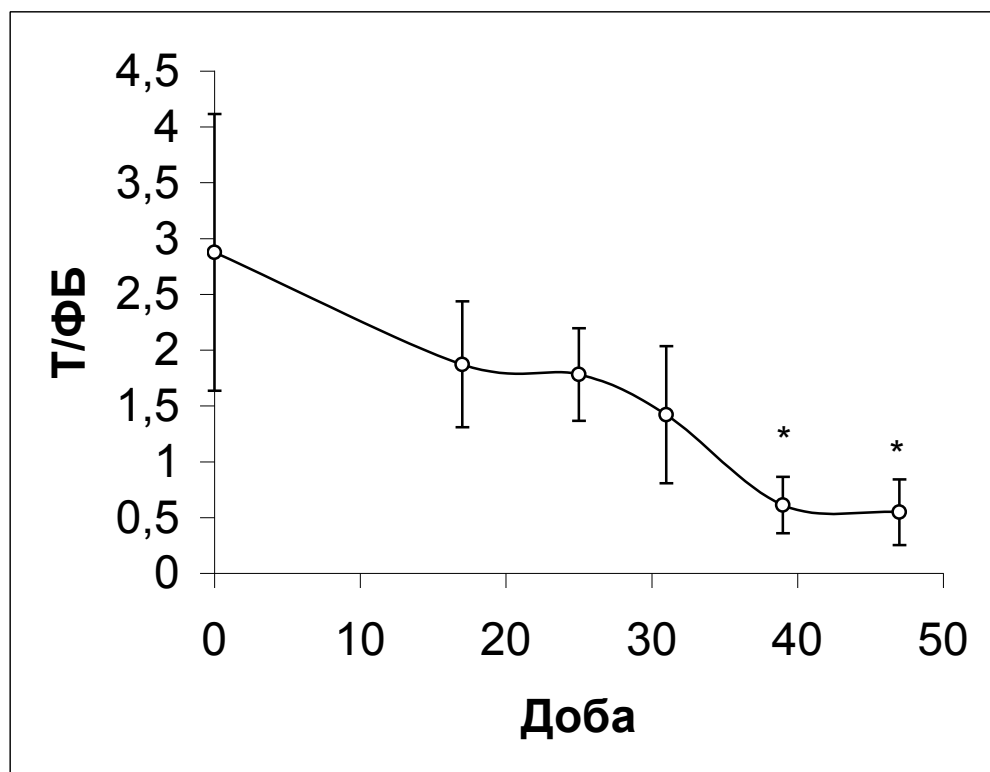


Рис. 3.10. Відношення кількості тироцитів до фібробластів (Т/ФБ) у тканині ЩЗ щурів лінії SHR на різних термінах введення ПТУ. Примітка: * – показник значуще відрізняється по відношенню до 0 доби, $p < 0,05$.

В результаті проведення експериментів встановлено, що вплив ПТУ виражався у стимуляції гіпертрофічних та гіперпластичних процесів у ЩЗ щурів обох груп. При цьому гіпертензивні щури продемонстрували більшу

чутливість до дії ПТУ, оскільки показники маси ЩЗ, ВФЕ та ФНФ були значуще вище в порівнянні з щурами Вістар.

Потрібно відзначити, що встановлена динаміка морфологічних показників ЩЗ може вказувати на розвиток адаптивної відповіді з боку фолікулярної паренхіми органу. Це виражається в коливаннях розміру тироцитів, їх ядерно-цитоплазматичного відношення та фолікулярної площі у перший місяць після початку введення ПТУ. Лише після 30 діб ці показники залишаються на приблизно одному рівні. Таким чином, для відтворення стабільної моделі на щурах лінії SHR необхідним є введення ПТУ на більш, ніж місячному терміні.

3.2. Вплив ПТУ на морфологічні та біохімічні показники печінки та нирок щурів ліній SHR та Вістар

У ряді робіт показано системну токсичну дію ПТУ, яка призводить до зменшення маси тіла, лейкопенії, анемії, порушення згортання крові і пошкодження печінки [183–186]. З огляду на цей факт, при перевірці моделі необхідно було вивчити системні ефекти від введення ПТУ. Ймовірний механізм ПТУ-індукованого ушкодження печінки полягає в порушенні процесу детоксикації через зниження активності уридиндіфосфоглюкуронозил-трансферази [185, 186]. Численні спостереження свідчать про те, що в печінці ПТУ викликає паренхіматозний некроз, крововилив, руйнування часточкової будови, імуноопосередковані реакції у вигляді запального інфільтрату в органі та появи аутоантитіл в крові [186]. Виходячи з цього, нами було проведено гістологічний аналіз печінки щурів лінії SHR та Вістар, які отримували ПТУ протягом 39 діб.

У гістологічній структурі печінки щурів лінії SHR були виявлені патологічні зміни (рис. 3.11, б). Клітини носили ознаки жирової вакуолізації цитоплазми. Звертали на себе увагу повнокров'я центральних вен і розширені синусоїдні капіляри печінки. У багатьох з них спостерігалися еритроцити. У паренхімі органу виявлявся фокальний некроз у вигляді невеликих ділянок

збільшених в розмірах клітин зі слабо-пофарбованої цитоплазмою, ядрами з ознаками каріопікнозу або каріорексису. У щурів Вістар повнокров'я судин було менш вираженим (рис. 3.11, в), проте спостерігалось потовщення стінок центральних вен. За допомогою морфометричного аналізу встановлено, що площа перерізу центральної вени печінки була більше в 1,6 раза у щурів лінії SHR у порівнянні з Вістар ($p < 0,05$).



Рис. 3.11. Мікрофотографії зрізів печінки щурів лінії SHR (а, б) та Вістар (в) на 0 добу (а) та 39-ту добу (б, в) введення 0,1% ПТУ.

У нирках на 39 добу експерименту спостерігалися менш значні зміни в порівнянні з печінкою (рис. 3.12). У кірковому шарі нирок визначалися ниркові тільця з капілярними клубочками, оточеним сечовим простором і одношаровим плоским епітелієм капсули Шумлянського-Боумена. Епітелій проксимальних і дистальних каналців не носив виражених патологічних змін.

Основні відмінності нирок тварин, які отримували ПТУ протягом 39 діб, спостерігалися у ниркових тільцях. У зв'язку з цим, було проаналізовано середні площі ниркових тілець (S1), капілярних клубочків (S2) та сечового простору (S3), а також середню висоту епітелію парієтального листка капсули Шумлянського-Боумена.

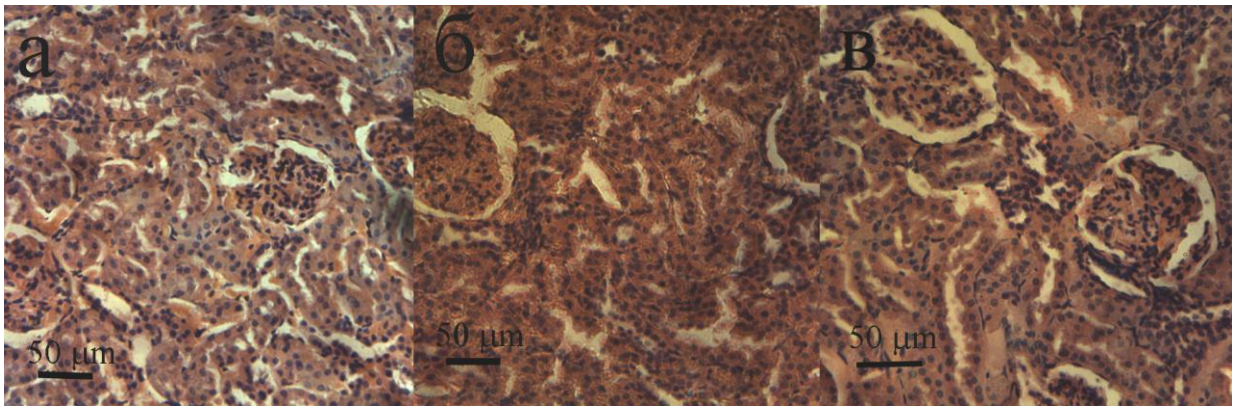


Рис. 3.12. Мікрофотографії зрізів нирки щурів лінії SHR (а, б) та Вістар (в) на 0 добу (а) та 39-ту добу (б, в) введення 0,1% ПТУ.

Таблиця 3.2. Морфологічні показники ниркових тілець у щурів лінії SHR за умов введення ПТУ.

№	Показник	Доба					
		0	17	25	31	39	47
1	S1 (мкм ²)	1496,4±	1977,1±	1790,2±	2203,3±	1791,6±	1935,7±
		368,0	389,5	327,5	321,6*	406,6	229,5*
2	S2 (мкм ²)	1013,9±	1225,3±	1133,5±	1408,8±	1008,6±	1220,9±
		286,7	403,8	436,8	431,9	326,6	533,2
3	S3 (мкм ²)	482,4±	751,8±	656,7±	794,4±	783,0±	714,8±
		110,3	267,3*	252,1*	286,0*	305,9*	451,1*
4	Висота епітелію (мкм)	0,7±	0,8±	1,0±	0,9±	1,0±	0,8±
		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Примітка: * – відмінності показника є статистично значущими в порівнянні з нульовою добою (К), $p < 0,05$.

Помітно, що на всьому терміні спостереження спостерігалось підвищення площі ниркового тільця (S1) в середньому в 1,5 рази (таблиця 3.2). При цьому, висота епітелію парієтального листка та площа капілярних клубочків (S2) значуще не змінювалася. Отже, це підвищення відбувалося за рахунок збільшення сечового простору (S3).

Відомо, що об'єм капсули Шумлянського-Боумена зазнає досить значних змін (в 5 разів) у здорових особин в залежності від фізіологічного стану [187]. Ознакою патологічних змін є у більшій мірі порушення розміру та структури капілярних клубочків [188]. В наших експериментах при введенні 0,1 % ПТУ впродовж 47 діб у щурів не спостерігалось значущих змін середньої висоти епітелію парієтального листка капсули та середньої площі капілярних клубочків. При цьому загальна площа ниркового тільця підвищувалася за рахунок розширення сечового простору, що може свідчити про розвиток компенсаторних процесів у паренхімі нирки гіпертензивних щурів на фоні ПТУ-індукованого гіпотиреозу.

Було визначено біохімічні показники сироватки крові щурів після прийому ПТУ (табл. 3.3). Значуще підвищення рівнів АЛТ (у 1,8 раза) і АСТ (у 2 рази) було зафіксовано в сироватці крові щурів лінії SHR у порівнянні з нормотензивними щурами Вістар на 39 добу введення ПТУ. При цьому значущих відмінностей в рівнях загального і прямого білірубіну виявлено не було. Це в цілому говорить про те, що під впливом ПТУ в більшій мірі протікають процеси цитолізу гепатоцитів з виходом індикаторних ферментів, ніж холестаз.

У наших експериментах не було виявлено явних структурних і функціональних порушеннях нирок під дією введення ПТУ у щурів обох груп, про що свідчать не тільки результати гістологічного дослідження, але й біохімічний аналіз рівнів сечовини і креатиніну (табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Біохімічні показники сироватки крові щурів лінії SHR та Вістар 39 добу введення 0,1% ПТУ.

Показник	SHR (ПТУ)		Вістар (ПТУ)		SHR (контроль)		Вістар (контроль)	
	М	ІР	М	ІР	М	ІР	М	ІР
АСТ, МЕ/л	195,5 #*	49,2	97,5 #	12,5	56,5	5,1	35,8	4,9
АЛТ, МЕ/л	71,0 #*	6,7	39,5 #	4,5	36,2	5,2	30,1	3,1
Білірубін загальний, мкмоль/л	2,0	0,3	1,3	0,7	2,56	0,2	1,6	0,4
Білірубін прямий, мкмоль/л	0,15	0,60	0,35	0,17	0,17	0,09	0,25	0,70
Сечовина, ммоль/л	6,8	1,3	5,0	0,4	5,8	0,7	4,9	0,9
Креатинін, мкмоль/л	44,0	9,4	36,4	18,2	47,6	6,9	40,1	11,3

Примітка: М - медіана; ІР - інтерквартильний розмах; # - показник значуще різниться в порівнянні з контролем відповідної групи, $p < 0,05$; * - показник щурів лінії SHR значуще різниться в порівнянні з показником щурів Вістар, $p < 0,05$.

Таким чином, було встановлено, що введення ПТУ характеризується вираженою гепатотоксичністю, та практично не має нефротоксичного ефекту. На тлі введення ПТУ відбуваються структурні зміни у паренхимі

печінки і її судинному руслі, При цьому, у тварин лінії SHR зміни рівнів амінотрансфераз і площі перерізу центральної вени печінки значуще вище в порівнянні з щурами Вістар.

3.3. Вплив ПТУ на морфологічні показники селезінки щурів

Аналіз мікроскопічної будови селезінки інтактних щурів лінії SHR показав наявність тонкої щільної волокнистої сполучнотканинної капсули зі багаточисельними колагеновими та еластичними волокнами, а також гладенькими міозитами (рис. 3.13, а). Ззовні капсула селезінки вкрита серозною оболонкою, до складу якої входять тонкий шар пухкої сполучної тканини та мезотелій. Від капсули в паренхіму органа відходять тонкі трабекули з трабекулярними артеріями та венами безм'язового типу. Паренхіма селезінки представлена білою та червоною пульпою. На гістологічних препаратах біла пульпа була представлена округлими або сферичними скупченнями, які включають центральну артерію периартеріальної лімфатичної муфти з Т-лімфоцитами, лімфатичний вузлик з В-лімфоцитами. Лімфатичні вузлики поділяються на зони: герменативний центр (реактивну зону) та мантийну зону з В-лімфоцитами, маргінальну зону з Т- та В-лімфоцитами, поодинокими макрофагами, дендритними та плазматичними клітинами, яка оточена маргінальним синусом з щілиноподібними порами. Лімфоцити в лімфатичних вузликах і ретикулярні волокна з плоскими ретикулярними клітинами розміщені концентрично навколо центральної артерії. Червона пульпа характеризується помірним повнокров'ям, у ній візуалізується ретикулярна строма та селезінкові тяжі Більтота, які представлені скупченням формених елементів крові (еритроцитів, макрофагів, плазматичних клітин, лейкоцитів на різних стадіях диференціювання та функціональної активності). Тяжі Більтота утворюють анастомози та розташовуються між венозними синусами. Стінка синусів утворена веретеноподібними ендотеліоцитами, базальною мембраною та має щілиноподібні пори.

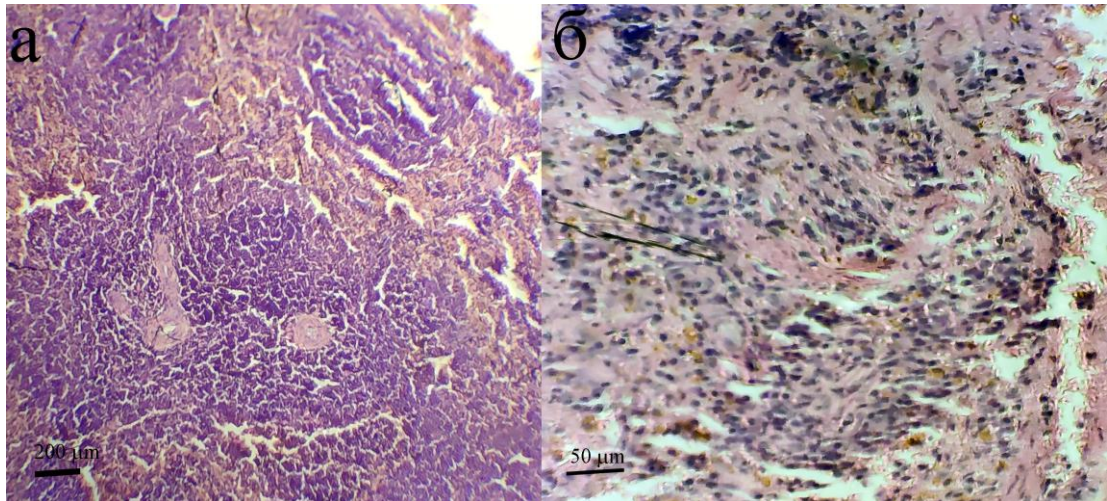


Рис. 3.13. Мікрофотографії зрізів селезінки щурів лінії SHR на 0 добу (а) та 39-ту добу (б) введення 0,1% ПТУ.

Після прийому 0,1% ПТУ аналіз гістологічних зрізів селезінки тварин не виявив суттєвих змін у білій пульпі. Лімфатична тканина білої пульпи тварин включала всі структурні елементи. На мікроскопічних препаратах добре ідентифікуються периартеріальні муфти та лімфатичні вузлики з типовою гістологічною структурою, але товщина стінок центральних артерій візуально перевищувала товщину артерій інтактних тварин. Введення ПТУ сприяло збільшенню щільності клітин червоної пульпи внаслідок кровонаповнення просторів між тяжами Більота. У червоній пульпі спостерігалось накопичення ліпофусцину. Центральні артерії мають потовщенні стінки та вузький просвіт. Прийом ПТУ призводив до набряку сполучної тканини строми селезінки та судинних розладів, які характеризувалися повнокров'ям трабекулярних вен і венозних синусів. Просвіт трабекулярних вен та венозних синусів візуально значно перевищував просвіт цих судин у інтактних тварин. На гістологічних препаратах вени та синуси заповненні кров'ю.

За допомогою морфометричного методу було проаналізовано (табл. 3.4) середні площі центральної артерії (ЦА), трабекулярної вени (ТВ) та венозних синусів (ВС).

Помітно, що показник площі перерізу ЦА різко збільшувався з $260,4 \pm 29,1$ мкм² (0 доба) до $328,5 \pm 26,9$ мкм² (17 доба). Потім з 25 до 39 доби відбувалася стабілізація показника у межах від $326,7 \pm 0,8$ до $339,9 \pm 45,7$ мкм². На 47 добу він підвищувався до $442,1 \pm 28,8$ мкм² ($p < 0,05$). Таким чином, після 47 діб прийому ПТУ площа перерізу ЦА селезінки підвищувалася приблизно у 1,7 рази.

Площа перерізу ТВ підвищувалася з $1778,1 \pm 54,8$ (0 доба) до $3306,8 \pm 364,9$ мкм² (25 доба, $p < 0,05$), потім на 31 добу відбувалося незначне зниження до $3298,2 \pm 336,1$ мкм² ($p < 0,05$). На 47 добу показник становив $3345,1 \pm 348,4$ мкм² ($p < 0,05$), що було у 1,9 рази вище, ніж на початку прийому ПТУ.

Таблиця. 3.4. Морфологічні показники судин селезінки у щурів лінії SHR на різну добу введення ПТУ.

Показник	Доба					
	0	17	25	31	39	47
Площа ЦА, мкм ²	$260,4 \pm 29,1$	$328,5 \pm 26,9$	$326,7 \pm 38,7$	$339,9 \pm 45,7$	$321,2 \pm 29,1$	$442,1 \pm 28,8^*$
Площа ТВ, мкм ²	$1778,1 \pm 227,1$	$2293,1 \pm 174,4^*$	$2546,9 \pm 222,4^*$	$3306,8 \pm 364,9^*$	$3298,2 \pm 336,1^*$	$3345,1 \pm 348,4^*$
Площа ВС мкм ²	$43,5 \pm 1,7$	$59,4 \pm 2,3^*$	$60,1 \pm 2,8^*$	$111,2 \pm 5,5^*$	$94,3 \pm 3,7^*$	$90,8 \pm 0,5^*$

Примітка: * – відмінності показника є статистично значущими в порівнянні з нульовою добою, $p < 0,05$.

Площа ВС поступово збільшувалася з $43,5 \pm 1,7$ (0 доба) до $111,2 \pm 5,5$ мкм² (31 доба, $p < 0,05$), після чого з 39 доби зменшувалася та залишалася до кінця терміну спостереження у межах від $94,3 \pm 3,7$ (39 доба) до $90,8 \pm 0,5$ мкм²

(47, доба, $p < 0,05$). В цілому, від початку прийому ПТУ площа ВС збільшувалася в 2 рази.

В результаті проведення експериментів встановлено вплив ПТУ на селезінку щурів лінії SHR, який в основному виражався в наявності венозного повнокров'я в органі.

3.4. Вплив ПТУ на морфологічні показники серця щурів

Мікроскопічна структура міокарда (рис. 3.14) інтактних щурів лінії SHR (0 доба) показала наявність характерних компенсаторних змін [189]. Були виявлені гіпертрофія і поліморфізм кардіоміоцитів. Спостерігалися кардіоміоцити, що містили як одне центрально розташоване базофільне ядро та оксифільну цитоплазму, так й двоядерні кардіоміоцити. Візуалізувалися поодинокі кардіоміоцити з пікнотичним ядром. Між кардіоміоцитами добре ідентифікувалась пухка сполучна тканина з численними капілярами, оксифільними колагеновими волокнами, фібробластами з плоскими та базофільними ядрами. Навколо великих і середніх судин концентрувалися пучки колагенових волокон. Виявлялися ділянки з нерівномірно гіпертрофованими м'язовими волокнами звивистій форми і фокальним міоцитолізом.

Аплікація ПТУ викликала виражені зміни структури міокарда у щурів лінії SHR. Особливо з 25 доби після прийому ПТУ в міокарді тварин візуально спостерігалися дегенеративно-дистрофічні зміни, які проявлялися зниженням щільності упаковки кардіоміоцитів, зміною їхньої форми та пікнозом ядер. У міокарді часто зустрічалися ділянки з фокальним міоцитолізом і інфільтрацією. Навколо стоншених м'язових волокон ідентифікувалися зони фіброзу у вигляді широких прошарків сполучної тканини з пучками оксифільних колагенових волокон і численними фібробластами.

На 39-47 добу після прийому ПТУ в міокарді візуалізувалися некротичні ділянки з відсутністю смугастості, які містили фрагментовані,

деструктуровані, без'ядерні кардіоміоцити; при цьому межі між клітинами слабо визначалися. В інтерстиціальній сполучній тканини навколо некротичних ділянок міокарда знижувалася кількість фібробластів, а капіляри були розширені і заповнені клітинами крові. Всі судини характеризувалися повнокров'ям, їх просвіт був змінений, стінки потовщені, а навколо них були виявлені великі прошарки сполучної тканини з колагеновими волокнами і численними фібробластами.

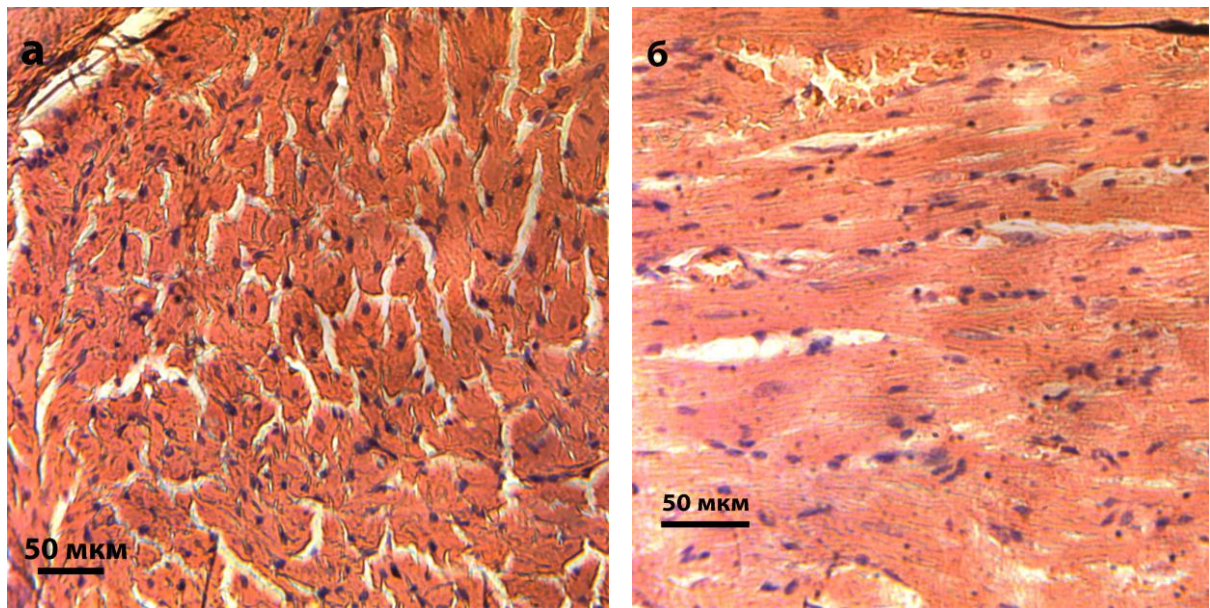


Рис. 3.14. Мікрофотографії зрізів серця щурів лінії SHR на 0 добу (а) та 39-ту добу (б) введення 0,1% ПТУ.

Аналіз кількісних морфометричних показників міокарда щурів після перших 25 діб прийому ПТУ виявив статистично значуще зменшення середньої площі цитоплазми кардіоміоцитів S_c (табл. 3.5). При цьому площа ядер кардіоміоцитів S_y змінювалася в порівнянні з нульовою добою прийому ПТУ, а достовірне збільшення їх ядерно-цитоплазматичного відношення (ЯЦВ) спостерігалось за рахунок зменшення цитоплазми. З 31 доби прийому ПТУ та до кінця спостереження (47 доба) відбувалося не тільки прогресуюче зменшення середньої площі цитоплазми кардіоміоцитів, а й площі їх ядер. У

зв'язку з цим ЯЦВ зменшувалося практично до вихідних значень, проте це було ознакою пікнозу ядер і дистрофічних змін у кардіоміоцитах.

Протягом 47 діб прийому ПТУ в тканини міокарда щурів лінії SHR в 4 рази знижувалася щільність кардіоміоцитів і в 2 рази підвищувалася щільність фіброblastів. Середня площа перерізу вен (Sv) зростала приблизно в 3 рази.

Таблиця 3.5. Морфологічні показники тканини міокарда щурів лінії SHR на різну добу введення ПТУ.

Показник	Доба					
	0	17	25	31	39	47
Сцк, мкм ²	350 (280; 392)	179 (140; 294) *	180 (148; 246) *	124 (105; 142) *	64 (59; 70) *	77 (65; 87) *
Сяк, мкм ²	29 (27; 31)	23 (19; 28)	28 (26; 32)	18 (16; 22) *	9 (8; 10) *	8 (7; 9) *
ЯЦВ	0,08 (0,07; 0,10)	0,12 (0,08; 0,16) *	0,15 (0,11 ; 0,19) *	0,14 (0,13; 0,19) *	0,1 4 (0,11; 0,16) *	0,1 0 (0,08; 0,10)
Щільніст ь кардіоміоцитів	20 (17; 22)	16 (14; 20) *	14 (12; 16) *	9 (7; 12) *	5 (4; 7) *	5 (3; 7) *
Щільніст ь фіброblastів	11 (9; 13)	15 (12; 19)*	20 (15; 25)*	20 (17; 22)*	21 (17; 25)*	22 (19; 27)*
Sv, мкм ²	166 5 (1430; 1900)	207 8 (1154; 2245)	3959 (2376; 4118)	2855 (2638; 3282) *	342 5 (3095; 3723) *	516 1 (4787; 5517) *

Примітка: * - показник статистично значуще відрізняється від нульової доби ($p < 0,05$).

Висновки за розділом:

1. При введенні 0,1% ПТУ впродовж 47 діб у ЩЗ гіпертензивних щурів лінії SHR і нормотензивних щурів Вістар спостерігався розвиток гіпертрофічних і гіперпластичних процесів, які виражалися у загальному підвищенні маси органу в середньому у 5,3 раза; збільшенні ВФЕ на $75,5 \pm 4,3\%$, площі фолікулів на $9,1 \pm 2,3\%$, ЯЦВ тироцитів на $39 \pm 5,4\%$, появи патологічних фолікулів з сосочковими структурами та активації проліферації фібробластів у стромі органу.

2. Для обох ліній щурів підтверджена гепатотоксичність ПТУ, яка виражалася в патологічних змінах гістологічної структури печінки, венозної гіперемії і зростанні рівнів амінотрансфераз.

3. Щури лінії SHR виявилися більш чутливими до тиреостатичної та гепатотоксичної дії ПТУ, ніж щури Вістар, що проявлялося в статистично значущому збільшенні показників ВФЕ, кількості патологічних фолікулів з сосочковими структурами, площі центральної вени печінкової часточки і рівнів амінотрансфераз.

4. Прийом ПТУ негативно впливав на показники кровообігу селезінки у щурів та призводив до підвищення середньої площі перерізу центральної артерії, трабекулярних вен і загальної площі венозних синусів за рахунок розширення просвіту судин та венозного повнокров'я.

5. Прийом ПТУ протягом призводив до порушення коронарного кровообігу і розвитку дистрофічних процесів в міокарді щурів, які проявлялися зменшенням площі кардіоміоцитів, пікнозом їх ядер, зниженням щільності кардіоміоцитів і збільшенням обсягу сполучної тканини.

Публікації за розділом: [24–27, 29–32].

РОЗДІЛ 4. ВИЗНАЧЕННЯ РЕЖИМУ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ З ПРОПІЛТІОУРАЦИЛ-ІНДУКОВАНОЮ ДИФУЗНОЮ ГІПЕРПЛАЗІЄЮ

Хімічна або термічна деструкція вузлових утворень ЩЗ останнім часом стала широко застосовуватися як метод малоінвазивного втручання. Розвиток ендоскопічної техніки дає можливість проводити подібні операції під візуальним контролем. Кріодеструкція застосовується не настільки широко, проте вже показана перспективність цього методу в терапії ДВУ ЩЗ [165, 168].

При реалізації методу необхідно враховувати, що результат кріохірургії залежить від індивідуальних особливостей тканини, температури і часу експозиції, кількості послідовних кріовпливів. До факторів, що перешкоджають зниженню температури в місці кріовпливу, відносять теплообмін навколишніх тканин, гістологічні особливості охолоджувальної тканини, швидкість кровообігу і мікроциркуляції, що є цілком справедливим й для ЩЗ, яка в нормі має високу швидкість кровообігу та щільність судинного русла, а під час гіперпластичних процесів спостерігається підвищення васкуляризації [190, 191]. Таким чином, патологічно змінена тканина ЩЗ буде відрізнятися за теплопровідністю та теплоємністю від нормальної. У зв'язку зі складністю отримання надійних розрахункових даних для досягнення необхідної температури заморожування, є необхідними модельні експерименти на лабораторних тваринах.

Відомо, що введення ПТУ експериментальним тваринам призводить до змін структури тканини, патоморфологічні ознаки яких подібні до тих, що спостерігаються при ДВУ ЩЗ [178, 192, 193]. У зв'язку з цим ця модель була обрана нами для проведення порівняльної оцінки температурних змін в процесі кріовпливу на тканину ЩЗ за умов дифузної гіперплазії.

По-перше, було визначено холодопродуктивність використаного у роботі кріоіаплікатора. Для цього за допомогою ТП відстежували

температуру кріоаплікатора після його охолодження у рідкому азоті (умови див. у розд. Матеріали та методи) та прикладання до поверхні розчину 5% бичачого сироваткового альбуміну (система, яка моделює білковий вміст колоїду ЩЗ) та до поверхні виділеної *ex vivo* ЩЗ (система, яка моделює біологічну тканину без кровообігу).

Помітно, що за обраних умов холодопродуктивності кріоаплікатору було достатньо для підтримування температури у цільовому діапазоні кріоушкодження тканин $-20\ldots-50^{\circ}\text{C}$ протягом 3 – 4,5 хв (рис. 4.1 та 4.2).

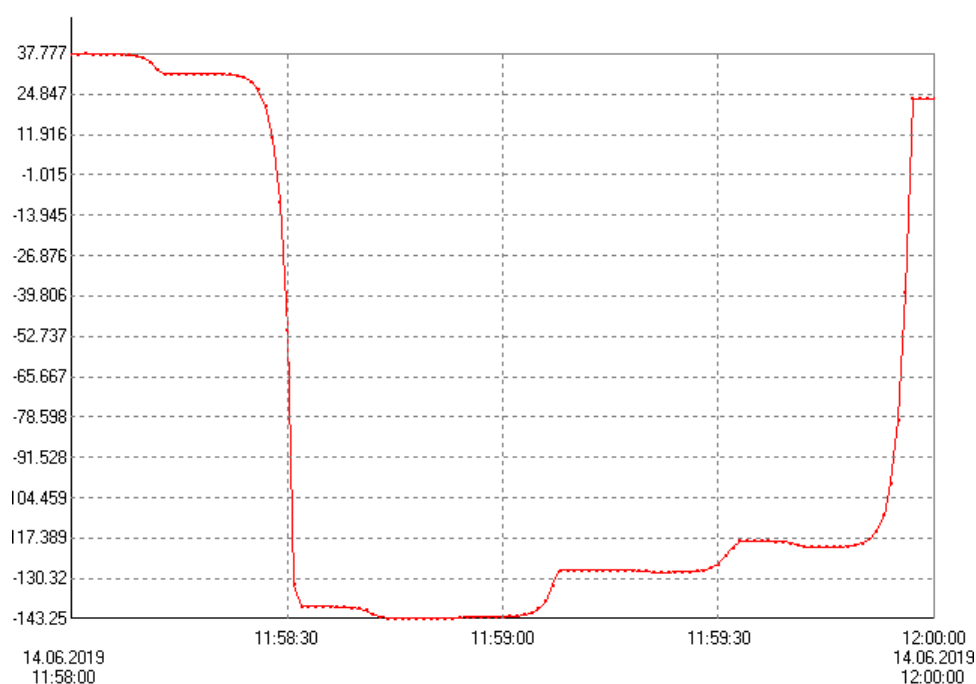


Рис. 4.1. Термограма охолодження-нагрівання, яку отримали за умов прикладання кріоаплікатора до поверхні розчину бичачого сироваткового альбуміну.

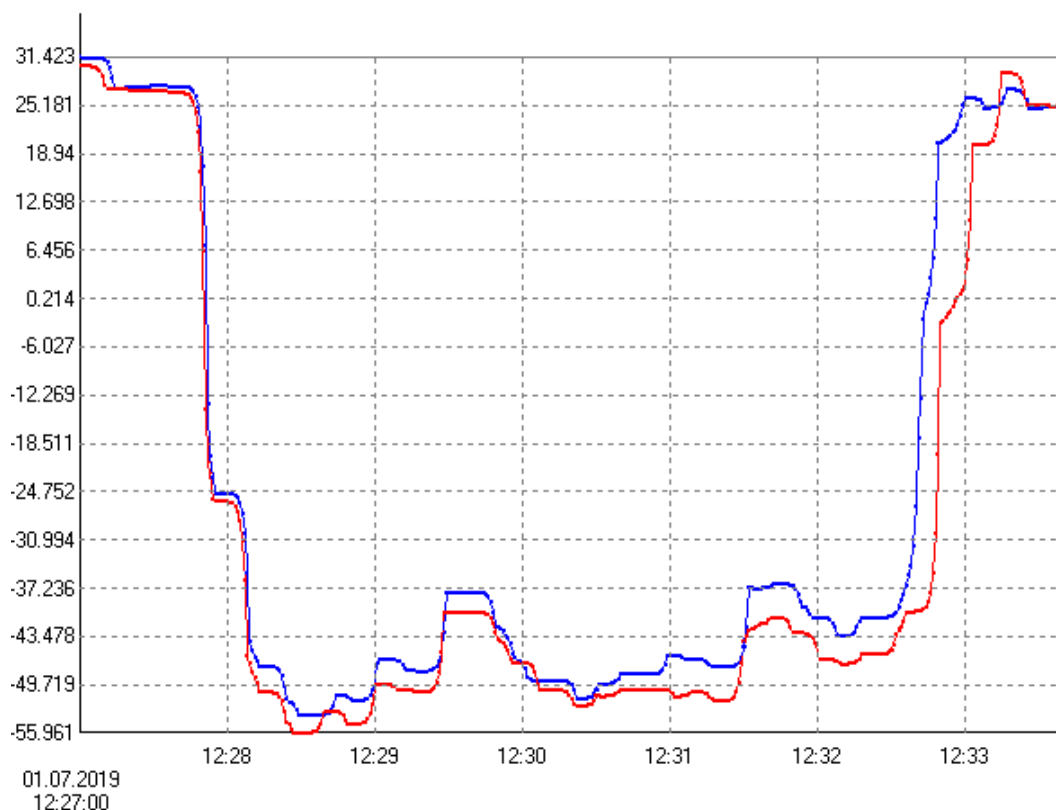


Рис. 4.2. Термограма охолодження-нагрівання, яку отримали за умов прикладання кріоаплікатора до поверхні виділеної *ex vivo* ЩЗ.

Таким чином, було встановлено, що використаний кріоаплікатор має достатню холодопродуктивність для підтримки температур, які визначаються у практиці кріохірургії як пошкоджуючі для біологічних тканин [11].

Для визначення відмінностей у «температурній історії» зразків інтактної або патологічно зміненої тканини ЩЗ кріовплив щурам здійснювали одноразово. За допомогою двох ТП, зафіксованих як показано на рис. 4.3, відстежували зміну температури при заморожуванні. Кріоаплікатор віднімали від зразка, коли температура досягала мінімального значення (температура, після якої зразок починав самовільно відігріватися). В процесі кріовпливу на ЩЗ в кожному експерименті спостерігали зону проморожування діаметром біля 3 мм.

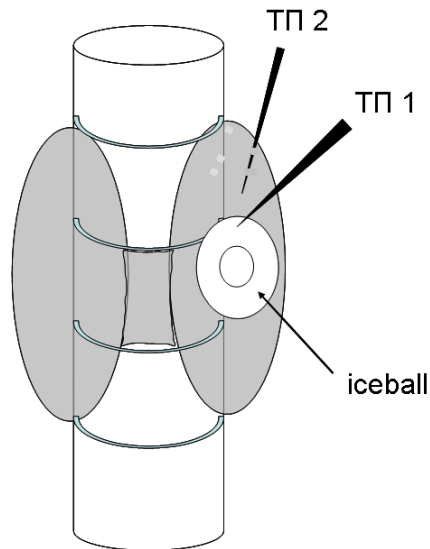


Рис. 4.3. Схема експерименту з кріодеструкції ЩЗ. 1 – положення ТП на поверхні ЩЗ близько зони проморожування (iceball); 2 – положення ТП в тканині ЩЗ біля зони проморожування (iceball).

Термограми охолодження, реєстровані в процесі заморожування зразків, мали загальну закономірність: наявність горизонтальної ділянки на початковому етапі охолодження ($\tau_0 \dots \tau_1$), впродовж якої температура зразка не змінювалася ($T_0 = T_1$) (рис. 4.4). Горизонтальна ділянка ($\tau_0 \dots \tau_1$) на кривій охолодження обумовлена взаємної компенсацією холодового впливу кріоаплікатору на тканину та питомої теплоти кристалоутворення, яка виділяється в процесі заморожування відповідної ділянки тканини. Довжина цієї ділянки при однакових умовах охолодження в значній мірі залежить від теплофізичних характеристик зразка і від особливостей його гістологічної структури.

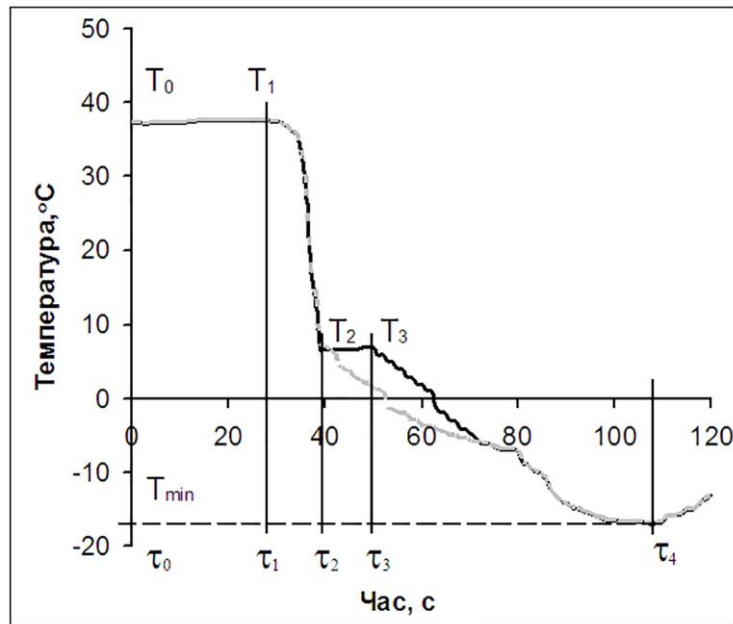


Рис. 4.4. Типовий вид термограми охолодження, яку одержували в експерименті, та параметри, які визначали за її допомогою.

Спостережуваний далі на кривих охолодження (рис. 4.4) різкий спад температури ($T_1 \dots T_2$) на ділянці ($\tau_1 \dots \tau_2$) пов'язаний з охолодженням нижчих шарів тканини. Достатня кількість холоду, що надходить від кріоаплікатору, забезпечує їх подальшу кристалізацію, при недостатньої його кількості відбувається повільне охолодження тканини без кристалоутворення. У першому випадку на кривій охолодження спостерігається ще одна горизонтальна ділянка ($\tau_2 \dots \tau_3$) в інтервалі температур ($T_2 \dots T_3$), в другому випадку – повільне зниження температури від значення T_2 до $T_{\min}$. Після досягнення $T_{\min}$ на ділянці кривій ($\tau > \tau_4$) спостерігається підвищення температури тканини ЩЗ внаслідок конвективного нагріву мідного аплікатору навколишнім повітрям.

Криві охолодження, отримані в експерименті на тваринах, можуть мати певні відмінності для різних особин, але загальний вигляд кривої охолодження зберігає описані тенденції.

Як впливає з рисунку 4.5, значення мінімальної температури ($T_{1\min}$), яка фіксувалася за допомогою 1-ї термопари (ТП1), знаходилися в інтервалі

від -24 до -47°C як при кріодеструкції ЩЗ інтактних, так і тварин з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією. Таким чином, при даному типі і конфігурації кріоаплікатора в «зоні проморожування» згідно класифікації зон кріоушкодження [117, 118], досягалася температура $-20\dots-50^{\circ}\text{C}$, незалежно від структури тканини ЩЗ. Показники медіан ΔT_2 , $\Delta \tau_{\min}$ та $\Delta \tau$ значуще не відрізнялися між зразками контрольної та експериментальною груп.

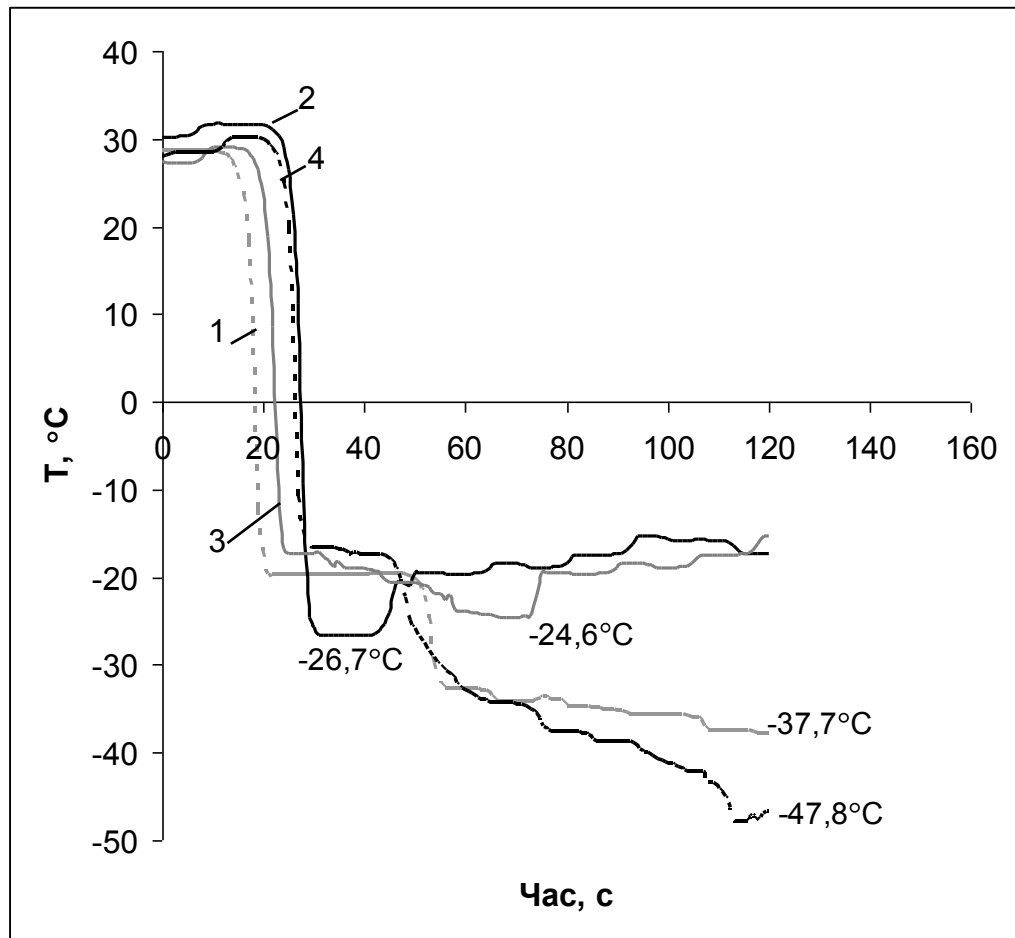


Рис. 4.5. Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ, які фіксувала ТП1 при кріодеструкції ЩЗ інтактних щурів (№1) та щурів з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією (№ 2, 3, 4). Цифрами вказана $T_{\min}$, досягнута в експерименті.

Термограми, які фіксувалися за допомогою 2-ї термопари (ТП2), характеризувалися меншими значеннями $T_{2\min}$ (від $4,8$ до $-14,5^{\circ}\text{C}$), що пояснюється більшою віддаленістю ТП2 від зони прикладення

кріоаплікатору (рис. 4.5, 4.6). Таким чином, зону, в якій фіксувалася така температура згідно класифікації зон кріопошкодження [117, 118] частково можливо було віднести до другої зони – «зони охолодження».

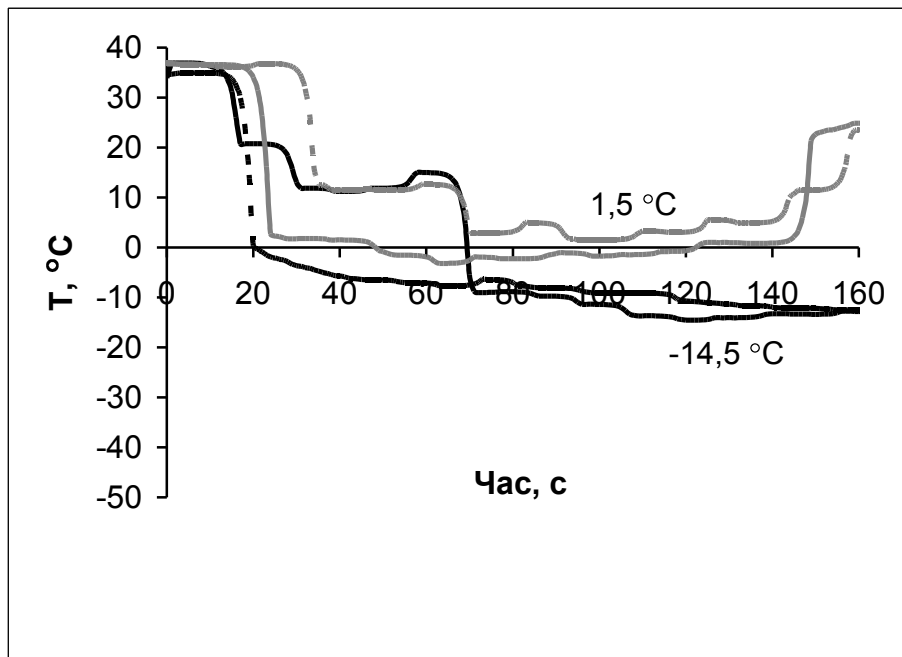


Рис. 4.6. Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ, які фіксувала ТП2 при кріодеструкції ЩЗ інтактних щурів. Цифрами вказана T_{min} , досягнута в експерименті.

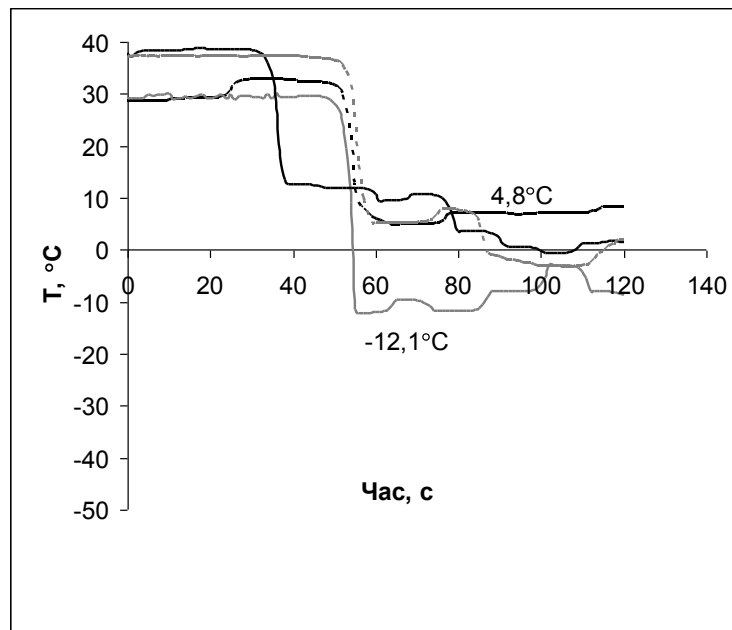


Рис. 4.7. Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ, які фіксувала ТП2 при кріодеструкції ЩЗ щурів з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією. Цифрами вказана T_{min} , досягнута в експерименті.

У цієї зоні значення медіан ΔT_2 и $\Delta \tau_{\min}$ значуще не відрізнялися між тваринами інтактної та експериментальної груп (таблиця 4.1), проте показник $\Delta \tau$, який характеризує довжину ділянки ($\tau_0 \dots \tau_1$), був статистично значуще ($p < 0,05$) більшим в зразках ЩЗ з дифузною гіперплазією порівняно з контролем (для інтактної тканини – 22,0 (17,0; 27,0) с; для тканини з дифузною гіперплазією – 52,0 (48,0; 56,0) с).

Таблиця 4.1. Значення параметрів, які визначалися на термограмах охолодження за допомогою ТП2, в експерименті з кріодеструкції ЩЗ

Показ- ник	$\Delta T_2, ^\circ\text{C}$		$\Delta \tau_{\min}, \text{с}$		$\Delta \tau, \text{с}$	
	Медіана $\pm$ ІР	р між групами	Медіана $\pm$ ІР	р між групами	Медіана $\pm$ ІР	р між групами
Інтактні	39,9 $\pm$ 12,0	0,53	101,0 $\pm$ 57, 0	0,83	22,0 $\pm$ 5,0	0,01
ПТУ	39,3 $\pm$ 8,8		72,0 $\pm$ 37,0		52,0 $\pm$ 4,0	

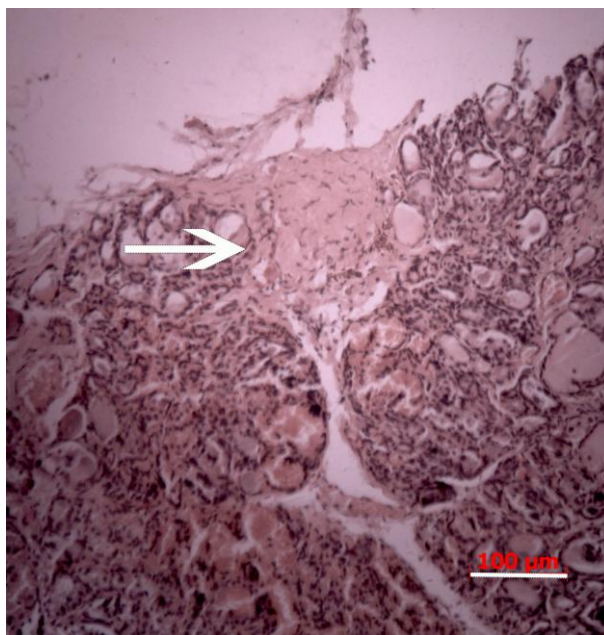
Таким чином, у модельній системі для обраного типу кріоаплікатора та його конфігурації при однакових вихідних умовах було встановлено відмінності між термограмами інтактної ЩЗ та зразками з ПТУ-індукованої ДГ, які корелюють з термофізичними характеристиками тканини. Виходячи з отриманих результатів, для підсилення кріоушкодження тканини за рахунок процесів, які спостерігаються у «зоні охолодження» [117, 118], для тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією експозиція кріоаплікатору має бути підвищена в середньому у два рази.

На наступному етапі було проведено експерименти з вивчення патоморфологічних змін ЩЗ щурів з дифузною гіперплазією при різних режимах кріовпливу. Для порівняння вибрали 2 режими: №1 – одноразовий

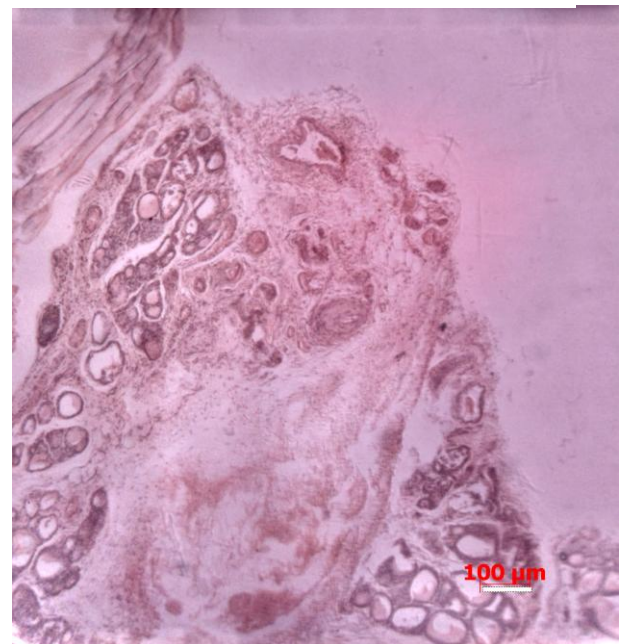
кріовплив з експозицією кріоаплікатора протягом 60 с; №2 – дворазовий кріовплив з експозицією кріоаплікатора протягом 120 с кожне.

Гістологічний аналіз зразків ЩЗ, підданих кріодеструкції в обох режимах, показав патологічні зміни тканини на 21 добу після операції. У тканині, підданій кріовпливу в режимі 1, спостерігалася вогнище фіброзу у вигляді півкулі з вираженими ознаками васкуляризації та незначною лімфоцитарно-гістіоцитарною інфільтрацією (рис. 4.8, А). При цьому глибина, на яку поширювалися фіброзні зміни, в середньому становила $279,5 \pm 50$ мкм, а ширина – $384 \pm 165,5$ мкм.

За умов кріовпливу в режимі 2 у тканині ЩЗ спостерігалися подібні гістопатологічні зміни (рис. 4.8, Б), проте зона фіброзу була набагато більше. Вона поширювалася в глибину на $1156,5 \pm 185,7$ мкм, а в ширину – на $812,5 \pm 189$ мкм.



А



Б

Рис. 4.8. Мікрофотографії зрізів ЩЗ з дифузною гіперплазією на 21-ту добу після кріовпливу: А – кріовплив в режимі 1 (одноразовий кріовплив протягом 60 с); Б – кріовплив в режимі 2 (дворазовий кріовплив протягом 120 с). Стрілкою позначено зону фіброзу.

Клітини різних тканин демонструють різні порогові значення холодової чутливості. В роботі Pomorski L. і співавт. [194, 195] для нормальної тканини ЩЗ щурів було визначено, що деструкція тканини у вигляді фібротичних змін спостерігається вже за умов експозиції кріоаплікатора протягом 45 с. У нашій роботі встановлені умови кріодеструкції тканини ЩЗ з патологічно зміненою структурою, які включають два кріовпливи з експозицією протягом 120 с.

Одним з принципових моментів в кріохірургії є забезпечення локальної деструкції тканини при досить низьких температурах, але з одночасним збереженням прилеглих життєво-важливих структур. Таким чином, для кожного типу кріохірургічної операції необхідно визначити температури, які спостерігаються під час кріовпливу не тільки у зоні прямого кріоушкодження. В наших експериментах принципово важливим було з'ясувати, яка температура спостерігається в тканині ЩЗ, прилеглій до трахеї (рис. 4.9).

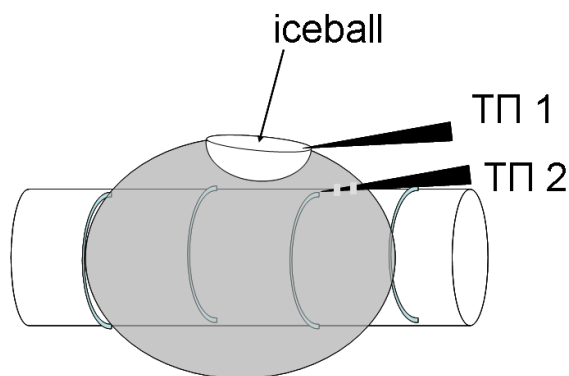


Рис. 4.9. Схема експерименту з визначення температури близько трахеї за кріодеструкції ЩЗ. 1 – положення ТП1 на поверхні ЩЗ близько зони проморожування (iceball); 2 – положення ТП2 в тканині ЩЗ близько трахеї.

При одночасному моніторингу температури за допомогою ТП1 (близько зони проморожування) та ТП2 (у трахеї) було встановлено, що при застосуванні кріовпливу з експозицією 120 с в області трахеї мінімальна

температура $T_{3\min}$ знаходилася в діапазоні гіпотермії ($0...+5^{\circ}\text{C}$) або субнульових температур ($0...-3,1^{\circ}\text{C}$), а в зоні проморожування показник $T_{1\min}$ сягав до $-41,3^{\circ}\text{C}$ (рис. 4.10).

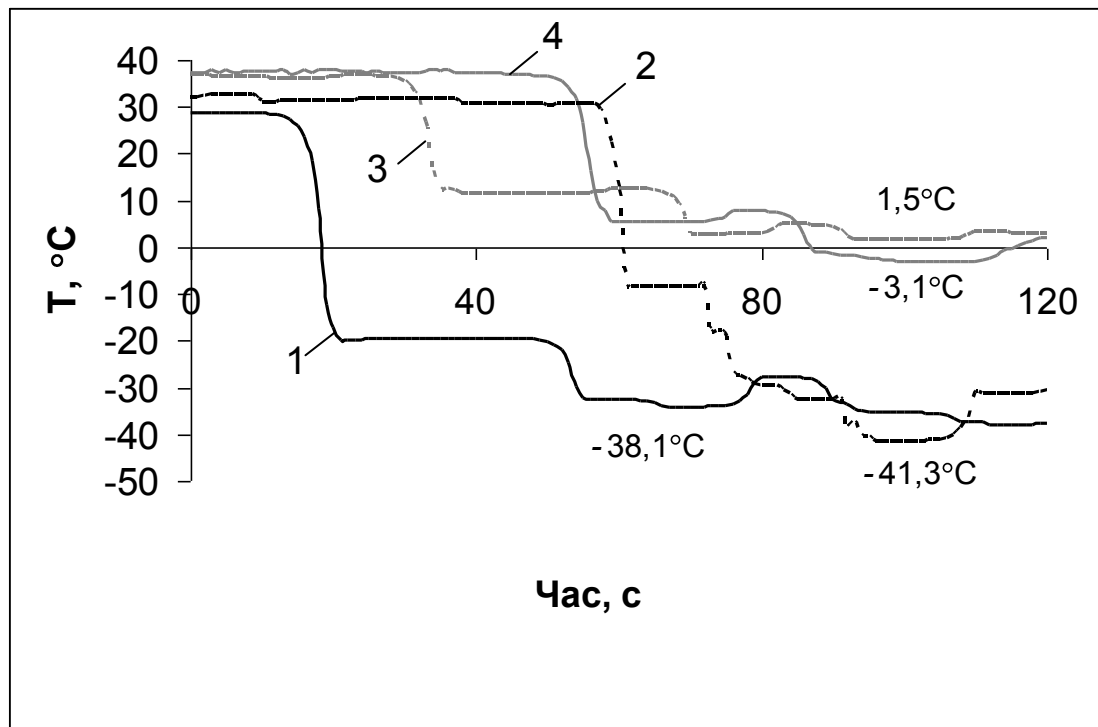


Рис. 4.10. Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ щурів груп 1 (криві 1, 3) та 2 (криві 2, 4), які одночасно реєструвалися ТП1 (криві 1, 2) та ТП2 (криві 3,4). Цифрами вказана $T_{\min}$, досягнута в експерименті. Приведені дані двох експериментів.

Висновки за розділом:

1. Порівняльне вивчення температурних змін в процесі кріовпливу для обраного типу кріоаплікатора та його конфігурації при однакових вихідних умовах дозволило встановити відмінності між термограмами інтактної ЩЗ та зразками з ПТУ-індукованої дифузною гіперплазією. Для підсилення кріоушкодження такої патологічно зміненої тканини експозиція кріоаплікатору має бути підвищена в середньому у два рази у порівнянні з інтактною тканиною ЩЗ.

2. За умов кріодеструкції у щурів ЩЗ з дифузною гіперплазією для досягнення ефекту руйнування тканини на глибину більше ніж 1 мм необхідно проводити дворазовий кріовплив з експозицією кріоаплікатору впродовж 120 с.
3. При кріодеструкції ЩЗ з дифузною гіперплазією кріоаплікатором з вищеназваними характеристиками протягом 120 с в зоні проморожування досягаються цільові значення температури (-20°C та нижче), тоді як в зоні трахеї спостерігаються навколо нульові температури, які не є критично-низькими для життєво-важливих структур.

Публікації за розділом: [33, 34, 35].

РОЗДІЛ 5. ПОРІВНЯЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR ТА ВІСТАР

Як відомо, результат кріохірургічного втручання буде залежати від індивідуальних особливостей тканини, температури, яку генерує кріоаплікатор, часу експозиції, кількості циклів «заморожування-відтаювання». Крім того, як було раніше встановлено, параметри кровообігу (наявність крупних судин, площа мікроциркуляції тощо) тканини мають значний вплив на ефективність кріодеструкції, перешкоджаючи зниженню температури [196].

Як було встановлено раніше, спонтанно-гіпертензивні щури лінії SHR характеризуються генетично-детермінованими змінами у серцево-судинній системі [21, 197]. На відміну від щурів Вістар, які були основою для селективного інбредінгу лінії SHR, вони мають підвищені показники систолічного тиску, фібротичні зміни судинного русла, потовщення стінки судин, гіперплазію гладеньком'язових клітин у *t. media* [198–200]. Оскільки ЩЗ відноситься до органів з великою швидкістю кровообігу, вона має щільну васкуляризацію [190, 191], патологічні зміни судинного русла у щурів з АГ повинні впливати на теплопровідність та теплоємність тканини ЩЗ, а значить – й на результат її кріодеструкції.

З огляду на ці передумови, метою наступного етапу роботи було визначення впливу стану артеріальної гіпертензії на результат кріодеструкції ЩЗ. Для цього проводили дослідження показника деструкції тканини у вигляді фіброзу після кріодеструкції ЩЗ у нормо- та гіпертензивних щурів. Крім того, для отримання даних щодо впливу комплексу патологічних змін, які спостерігаються за умов одночасної АГ та дифузної гіперплазії, на результат кріодеструкції було вивчено групи тварин обох ліній з введенням ПТУ. Відповідно до 3-х зон кріоушкодження, які формуються в тканині після кріовпливу [117], отримані у кожному зрізі показники площі зони фіброзу ранжирували від мінімальної до максимальної та порівню поділяли на 3

групи: мінімальну (Sf_{min}), середню (Sf_{med}) та максимальну (Sf_{max}) площу фіброзу.

Гістологічний аналіз зрізів показав, що у місці кріовпливу в тканині ЩЗ як гіпер-, так й нормотензивних тварин на 21 добу формується добре помітна зона фіброзу (рис. 5.1). Вона є конусоподібною, рідше – трапецієподібною, розширеною на поверхні (у місці контакту кріоаплікатору з тканиною) та звужується в глибині залози. В зоні відсутня характерна для ЩЗ часточкова-фолікулярна будова. Паренхіма залози заміщена сполучною тканиною з вираженою васкуляризацією та незначною лімфоцитарно-гістіоцитарною інфільтрацією. На периферії зони, рідше – у центрі, спостерігаються поодинокі мікрофолікули або їх скупчення.

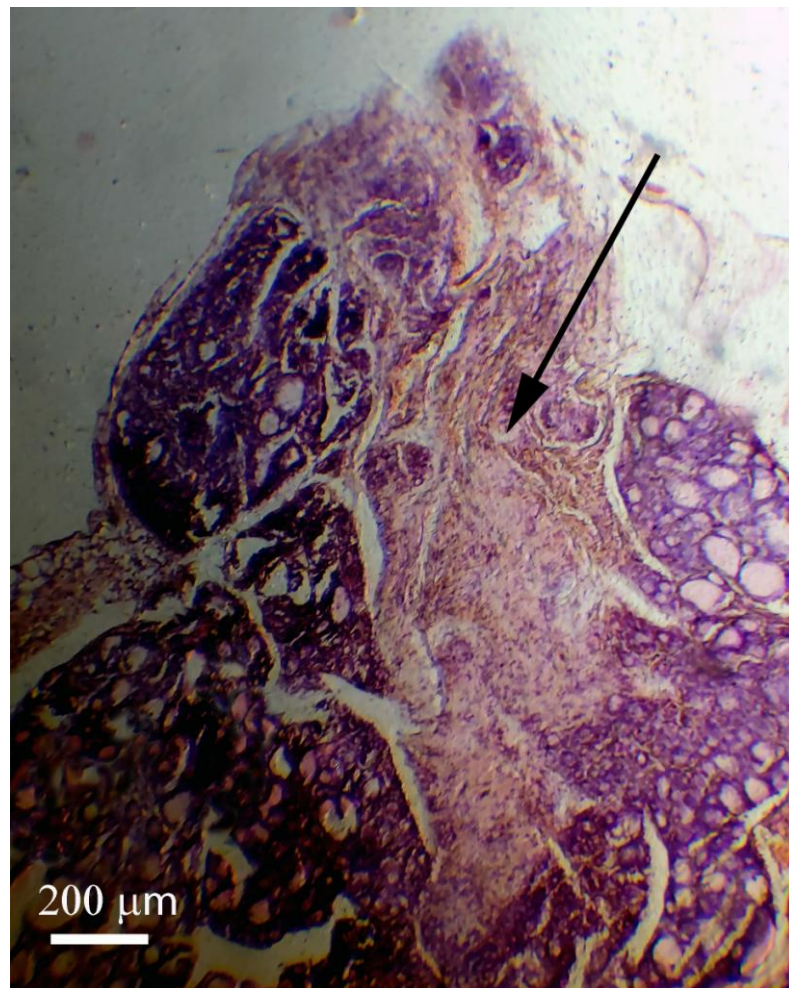


Рис. 5.1. Репрезентативна мікрофотографія зрізу ЩЗ щурів на 21-у добу після кріовпливу. Стрілкою позначено зону фіброзу.

Морфометричні показники площі зони фіброзу S_f наведені у таблиці 5.1. Помітно, що кріовплив у використаному режимі не приводив до значущих змін показника у гіпер- та нормотензивних тварин інтактних груп.

Однак після кріодеструкції ІЦЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією у нормотензивних щурів спостерігалось статистично значуще зменшення зони фіброзу для показників $S_{f_{med}}$ на 47,3% та $S_{f_{max}}$ на 45%. У гіпертензивних щурів відбувалося теж саме: статистично значуще зменшення зони фіброзу для показників $S_{f_{min}}$ на 70,9%, $S_{f_{med}}$ на 74,1% та $S_{f_{max}}$ на 68,3%.

Таблиця 5.1. Середня площа фіброзу у гістологічних зразках ІЦЗ щурів Вістар та SHR на 21 добу після кріовпливу.

Група тварин	$S_{f_{min}}, \text{мм}^2$	$S_{f_{med}}, \text{мм}^2$	$S_{f_{max}}, \text{мм}^2$
Умови експерименту			
Вістар, інтактні	$0,69 \pm 0,17$	$1,27 \pm 0,27$	$2,07 \pm 0,16$
SHR, інтактні	$0,53 \pm 0,21$	$1,29 \pm 0,31$	$2,08 \pm 0,21$
Вістар, ПТУ	$0,41 \pm 0,10$	$0,67 \pm 0,12\#$	$1,14 \pm 0,11\#$
SHR, ПТУ	$0,16 \pm 0,06^{*}\#$	$0,37 \pm 0,14\#$	$0,66 \pm 0,06^{*}\#$

Примітка: * - показник значуще розрізняється між гіпертензивними (SHR) та нормотензивними (Вістар) щурами, $p < 0,05$; # - показник значуще розрізняється в порівнянні з інтактними тваринами відповідної лінії, $p < 0,05$.

У гіпертензивних тварин з введенням ПТУ встановлено значуще зменшення показників $S_{f_{min}}$ (на 60,9%) та $S_{f_{max}}$ (на 42,1%), та тенденція до зменшення $S_{f_{med}}$ (на 44,7%) в порівнянні з нормотензивними тваринами з введенням ПТУ (таблиця 5.1). Це свідчило про те, що тканина ІЦЗ у гіпертензивних щурів з введенням ПТУ є більш стійкою до кріодеструктивного впливу порівняно з нормотензивними.

У попередньому розділі нами було встановлено, що низка гістопатологічних змін у ІЦЗ щурів лінії SHR та Вістар при введенні ПТУ

включає збільшення маси ЩЗ, висоти фолікулярного епітелію, кількості патологічних фолікулів з сосочковими структурами, зменшенням колоїдного вмісту у фолікулах (див. розділ 3). На фоні гіперплазії епітелію спостерігається зменшення фолікулярного простору і, завдяки цьому, ущільнення тканини та зміна її теплопровідності та теплоємності в порівнянні з нормальною тканиною. Можливо, у зв'язку з цим кріохірургія гіперплазованої тканини ЩЗ потребує більш тривалої експозиції кріоаплікатору для досягнення заданого об'єму деструкції. При цьому той факт, що ЩЗ щурів лінії SHR є більш стійкою до кріовпливу може пояснюватися тим, що, як було нами встановлено, вона є більш чутливою до дії ПТУ та у більшій мірі набуває патологічних змін.

Стан, що характеризується підвищеним рівнем артеріального тиску, значно не впливає на результат кріодеструкції ЩЗ щурів. Однак після маніфестації патологічних змін, характерних для гіперпластичних процесів, спостерігається підвищення стійкості тканини ЩЗ до кріодеструкції, що потрібно враховувати при виборі режиму кріовпливу.

Висновки за розділом:

1. Встановлено, що у інтактних щурів SHR та Вистар площа фібротичних змін у ЩЗ на 21 добу після кріовпливу значно не відрізняється між собою, тобто стан артеріальної гіпертензії значуще не впливає на результат кріохірургії ЩЗ.
2. У ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією спостерігається підвищення стійкості до кріодеструкції у нормо- та гіпертензивних щурів. Це проявлялося у статистично значущому зменшенні зони фіброзу ЩЗ нормо- та гіпертензивних щурів для показників Sf_{med} на 47,3 та 74,1%; Sf_{max} на 45 та 68,3%, відповідно, та показника Sf_{min} на 70,9% для гіпертензивних щурів.

3. Підвищення стійкості тканини ЩЗ у гіпертензивних щурів відбувається у більшій мірі порівняно з нормотензивними тваринами, що проявлялося у значущому зменшенні показників фібротичних змін $S\phi_{\min}$ (на 60,9%) та $S\phi_{\max}$ (на 42,1%).

Публікація за розділом: [28].

РОЗДІЛ 6. ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РЕЗЕКЦІЇ ТА КРІОДЕСТРУКЦІЇ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ЩУРІВ ЛІНІЇ SHR

Відомо, що ЩЗ відноситься до органів з повільним оновленням клітин [201]. У той же час здатність до проліферації у відповідь на фізіологічну або патологічну стимуляцію зберігається у клітин ЩЗ протягом усього життя. Резекція ЩЗ, яка викликає гіпотиреоз, є одним з активаторів гіперпластичних процесів, спрямованих на підтримку продукції тиреоїдних гормонів. При цьому компенсаторна гіперплазія органу може призводити до порушення його нормального гістологічної будови [202].

Оскільки кріодеструкція є перспективним способом видалення доброякісних вузлових утворень ЩЗ, для подальшого впровадження його в клінічну практику необхідні дослідження, спрямовані на оцінку результатів лікування в порівнянні з класичними методами резекції.

Виходячи з цього, завданням наступного етапу було порівняльне вивчення результатів резекції та кріодеструкції частки ЩЗ у щурів лінії SHR з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією. Для цього одній групі щурів виконували резекцію лівої частки залози, при цьому перешийок залишали інтактним, а тиреоїдний залишок становив 1/5 лівої частки. Щурам іншої групи проводили кріодеструкцію лівої частки ЩЗ у режимі, встановленому у попередніх дослідженнях (див. розділ 4; два кріовпливу з експозицією протягом 120 сек).

Згідно з дослідженнями попередніх авторів [14, 202, 203, 204] до ознак регенеративних процесів у ЩЗ відносять: наявність клітинних мітозів; збільшення висоти фолікулярного епітелію (ВФЕ); підвищення кількості С-клітин; наявність інтерфолікулярних острівців (ІФО), з яких виникають нові фолікули; наявність фолікулів неправильної форми (ФНФ). Ці ознаки характерні для тиреоїдного залишку після резекції ЩЗ, виконаної в достатньому обсязі.

Відомо, що білок Ki-67 широко експресується у клітинах, що діляться, тоді як у клітинах у стані спокою (G0) він не присутній [205]. Завдяки цьому, Ki-67 є одним із загальноприйнятих маркерів проліферації клітин та може бути визначений за допомогою специфічних антитіл методом імуногістохімії.

У наших експериментах було проаналізовано ряд гістологічних та імуногістохімічних показників, що характеризують репаративну регенерацію тканини ЩЗ та її гормональний профіль у експериментальних тварин на різні терміни після операції (рис. 6.1, 6.2, таблиця 6.1).

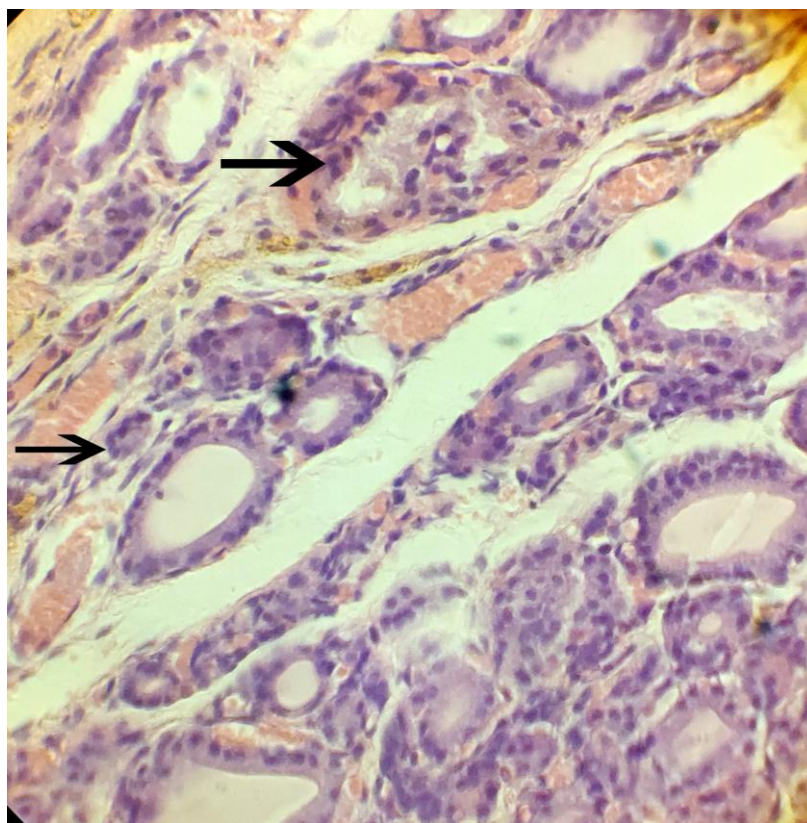


Рис. 6.1. Наявність інтерфолікулярних острівців та фолікулів неправильної форми (вказано стрілками) у тиреоїдному залишку на 30-ту добу після резекції тканини ЩЗ.

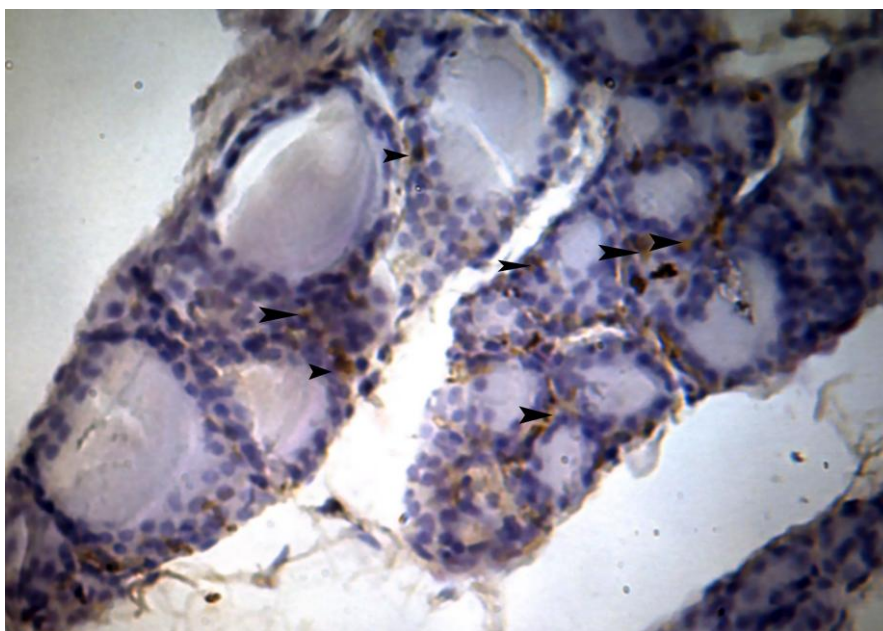


Рис. 6.2. Наявність Ki-67-позитивних клітин (вказано стрілками) у паренхімі та стромі ЩЗ (тиреоїдному залишку) на 30-ту добу після кріодеструкції.

Аналіз гістологічних зрізів ЩЗ показав на 30-ту та 60-ту добу збільшення кількості ІФО у тварин як з резекцією (у 3,9 та 6,8 рази, відповідно), так й з кріодеструкцією (у 2,6 та 5 разів, відповідно) у порівнянні з контрольними хібно-оперованими тваринами (табл. 6.1). Кількість ФНФ збільшувалася на 30-ту та 60-ту добу у тварин з резекцією у 2,2 та 1,3 рази, відповідно, тоді як у тварин з кріодеструкцією у 2,7 та 1,8 рази, відповідно. Крім того, на 30-ту добу спостерігалось значуще збільшення кількості С-клітин у щурів з резекцією. У щурів з кріодеструкцією цей показник також мав тенденцію до зростання. Значення середньої ВФЕ у ЩЗ щурів обох експериментальних груп значуще не відрізнялися від контролю, хоча були підвищені.

При порівнянні кількісних ознак регенеративних процесів між групами з кріодеструкцією та резекцією, було відзначено статистично значуще

збільшення кількості С-клітин (кріодеструкція – 78,0 (61,3; 91,9); резекція – 106,3 (100,4; 117,2)) та ІФО (кріодеструкція – 5,0 (4,4; 5,3); резекція – 7,5 (7,2; 8,1)) у групі тварин з резекцією.

Таблиця 6.1. Морфологічні показники тиреоїдного залишку лівої частки ЩЗ у щурів експериментальних та контрольної (хибно-оперованої) груп.

Група тварин		ВФЕ, мкм	Кількість С-клітин, ‰	Кількість ІФО на ПЗ	Кількість ФНФ на ПЗ
Резекція	30	8,4	106,3*#	7,5*#	1,6*
	доба	(7,9; 8,9)	(100,4; 117,2)	(7,2; 8,1)	(1,2; 2,0)
	60	8,0	52,3	6,8*#	1,5*
	доба	(7,8; 8,1)	(44,6; 59,5)	(6,2; 7,6)	(1,4; 1,6)
Кріо-деструкція	30	8,0	78,0	5,0*#	1,9*
	доба	(7,9; 8,1)	(61,3; 91,9)	(4,4; 5,3)	(1,8; 2,1)
	60	7,8	70,7	5,0*#	2,0*
	доба	(7,6; 8,0)	(67,0; 76,1)	(4,6; 5,3)	(1,8; 2,1)
Контроль	30	7,2	51,5	1,9	0,7
	доба	(6,5; 7,7)	(48,1; 56,8)	(1,7; 2,1)	(0,3; 1,0)
	60	6,7	53,5	1,0	1,1
	доба	(5,9; 7,5)	(48,0; 61,1)	(0,1; 2,0)	(0,8; 1,5)

Примітка: * - показник значуще відрізняється порівняно з контролем, $p < 0,05$; # - показник значуще відрізняється між групами тварин з резекцією або кріодеструкцією на відповідну добу спостереження, $p < 0,05$.

Кількісні показники Ki-67-позитивних клітин представлені у таблиці 6.2. З результатів випливає, що на 30-ту добу після резекції та кріодеструкції ЩЗ кількість проліферуючих клітин у тиреоїдному залишку у 10 та 6,5 разів

відповідно, вище, ніж у тварин контрольної групи. На 60-ту добу цей показник ще залишається підвищеним порівняно з контролем (табл. 6.2).

Таблиця 6.2. Кількість Ki-67-позитивних клітин (у % на 100 клітин фолікулярного епітелію) у тиреоїдному залишку лівої частки ЩЗ у щурів експериментальних та контрольної (хибно-оперованої) груп.

Група тварин	Клітини Ki-67+, %	
	30 доба	60 доба
Резекція	10,0*# (7,0; 12,0)	8,5* (5,0; 11,3)
Кріодеструкція	6,5*# (4,5; 7,0)	5,5* (4,3; 6,3)
Контроль	1,0 (0,7; 2,0)	1,0 (0,7; 1,25)

Примітка: * - показник значуще різниться порівняно з контролем, $p < 0,05$; # - показник значуще різниться між групами тварин з резекцією або кріодеструкцією на відповідну добу спостереження, $p < 0,05$.

Кількість Ki-67-позитивних клітин у тиреоїдному залишку на 30-ту добу після резекції була значуще ($p=0,0117$) вище у 1,5 рази порівняно з групою тварин після кріодеструкції. На 60-ту добу така тенденція зберігалася, але значення показника зменшувалися у обох випадках.

Значуще підвищення рівня ТТГ було встановлено у щурів обох експериментальних груп через 30 діб після втручання (табл. 6.3). При цьому спостерігалася тенденція до зменшення рівня вільного Т4 в порівнянні з контролем. На 60-ту та 120-ту добу ці відмінності нівелювалися.

Рівень вільного Т3 не відрізнявся у щурів обох експериментальних груп на всіх досліджених терміни. Ці дані узгоджуються з результатами,

отриманими Clark О.Н. і співавт., які вже на 14 добу після резекції ЩЗ не встановили значної різниці даного показника в порівнянні з контролем [203].

Таблиця 6. 3. Рівень ТТГ, вільних Т3 і Т4 у щурів експериментальних та контрольної (хибнооперовані тварини) груп.

Група тварин		ТТГ, мМЕ/л	Т ₄ в, пмоль/л	Т ₃ в, пмоль/л
Резекція	30 доба	0,60* (0,10; 1,87)	11,10 (8,95; 13,95)	4,75 (4,50; 4,97)
	60 доба	0,03 (0,03; 0,10)	18,00 (16,72; 18,72)	4,60 (4,50; 4,75)
	120 доба	0,10 (0,08; 0,12)	18,80 (17,30; 20,40)	4,60 (4,40; 4,80)
Кріо- деструкція	30 доба	0,60* (0,45; 2,47)	11,60 (9,97; 13,92)	4,80 (4,50; 5,12)
	60 доба	0,17 (0,04; 0,35)	18,75 (17,80; 19,20)	4,70 (4,50; 4,95)
	120 доба	0,25 (0,17; 0,35)	17,65 (13,85; 21,80)	4,50 (4,42; 4,52)
Контроль		0,10 (0,07; 0,25)	17,30 (13,40; 20,70)	4,60 (4,50; 4,80)

Примітка: * - показник значуще різниться порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Проведені нами гістологічний, імуногістохімічний та біохімічний аналізи свідчать, що процеси регенерації в тканині ЩЗ спостерігаються як після резекції, так і після кріодеструкції, виконаної в режимі подвійного криовпливу протягом 120 секунд. В результаті цього рівні тиреоїдних гормонів у крові відновлюються після 1 місяця.

На основі порівняльної оцінки гістологічних та імуногістохімічних показників можна зробити висновок, що проліферативні процеси менш активно протікають в ЩЗ після кріодеструкції, ніж після резекції.

Висновки за розділом:

1. Після резекції або кріодеструкції в тканині ЩЗ гіпертензивних щурів спостерігаються процеси репаративної регенерації, про що свідчать збільшення висоти фолікулярного епітелію, підвищення кількості С-клітин, інтрафолікулярних острівців, фолікулів неправильної форми та кількості Ki-67-позитивних клітин.
2. Процеси неофолікулогенезу у тканині ЩЗ протікають більш активно після резекції, ніж після кріодеструкції, оскільки статистично значуще збільшення кількості С-клітин у 1,4 рази, інтерфолікулярних острівців у 1,5 рази, кількості Ki-67-позитивних клітин у 1,5 рази відбувалося у щурів після резекції.

Публікації за розділом: [22, 23].

РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ КОНТАКТНОГО НАГРІВАННЯ У ЦИКЛІ «ЗАМОРОЖУВАННЯ-НАГРІВАННЯ» НА РЕЗУЛЬТАТ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ТКАНИНИ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

В основі кріохірургічного методу лежить механічний фактор пошкодження клітин кристалами льоду, що утворюються при охолодженні [11, 110, 120, 206]. Як відомо, пошкодження біоб'єкту за умов кріоконсервування відбувається не тільки на етапі заморожування, але при його нагріванні у температурних інтервалах, де відбуваються процеси рекристалізації [110, 120, 207]. Інтенсивність рекристалізаційних процесів тим більше, чим вище була швидкість охолодження на етапі заморожування, тобто чим більш термодинамічно нестійка структура була сформована при заморожуванні [208]. Використання низької швидкості нагрівання в цьому інтервалі температур дає можливість посилити пошкодження тканин, що особливо важливо для ефективності процедури криодеструкції. Дійсно, цей принцип посилення кріоушкодження використовується у сучасній кріохірургії, оскільки загальноприйнятним є нагрівання замороженої тканини за рахунок натурального конвективного теплообміну, тобто самонагрівання тканини («пасивне нагрівання») [8, 11, 110, 120]. Однак при такому підході неможливо стандартизувати «температурну історію» кожного циклу «заморожування-нагрівання», що знижує відтворюваність результатів криодеструкції через мінливість параметрів при самонагріванні. У зв'язку з цим, розробка підходів до контрольованого нагрівання тканини при кріохірургії є дуже актуальним завданням.

Теоретично, пошкодження біоб'єкту, отримані на етапі охолодження, можуть бути посилені за рахунок використання «активного» нагрівання в тих температурних інтервалах, де на етапі нагрівання відбуваються процеси рекристалізації, тобто укрупнення кристалів льоду. У модельній системі було встановлено, що після плавлення евтектики фізіологічного розчину у температурному інтервалі $-21...-15^{\circ}\text{C}$ відбувається рекристалізація перед

плавленням основної маси льоду та далі безпосередньо її плавлення в інтервалі температур $-15 \dots -4,5^{\circ}\text{C}$ [208, 209]. Регуляція швидкості нагрівання у зазначеному температурному інтервалі може посилювати кріодеструктивні процеси в тканині за рахунок рекристалізації.

Також важливий момент, який слід враховувати для посилення ефективності процедури кріодеструкції, це безпосередній контакт аплікатора з тканиною при нагріванні. Як правило, нагрівання тканини при кімнатній температурі за рахунок конвективного теплообміну не гарантує повторюваності результатів через мінливість зазначених параметрів. Використовуючи безпосередній контакт термоаплікатора з тканиною, можна підвищити ефективність кріодеструкції, а додаткове використання контрольованої температури термоаплікатора підвищує повторюваність отриманих результатів.

Виходячи з вищесказаного, наступною задачею роботи було вивчення впливу контактного нагрівання у циклі «замороження-нагрівання» на результат кріодеструкції тканини щитоподібної залози.

В експериментах використовували щурів лінії SHR, яким здійснювали кріодеструкцію тканини ЩЗ у режимі одноразової експозиції кріоаплікатору, охолодженого до температури рідкого азоту, до того моменту, коли було досягнуто цільова температура нижче -20°C та температура починала мимовільно підвищуватися. В залежності від індивідуальних особливостей тварин цей період складав 60–90 сек. У цей момент кріоаплікатор прибирали та проводили: 1) пасивне неконтрольоване нагрівання (НН), при якому тканина нагрівалася за рахунок теплообміну з навколишнім середовищем; 2) активне контактне нагрівання (КН), при якому до місця кріовпливу прикладали мідний аплікатор (теплоаплікатор), нагрітий до температур 40, 50 і 60°C . Важливо відзначити, що теплоаплікатор був більший за діаметром, ніж кріоаплікатор. Теплоаплікатор прибирали, коли температура досягала 28-

30°C. Через 21 добу тварин виводили з експерименту, ЩЗ піддавали гістологічному аналізу.

Термограми (рис. 7.1 – 7.4), реєстровані в процесі заморожування-нагрівання тканини ЩЗ, мали горизонтальну ділянку на початковому етапі охолодження, впродовж якої температура зразка не змінювалася. Після цього спостерігався різкий спад температури, пов'язаний з охолодженням нижчих шарів тканини. При цьому середня швидкість охолодження складала в середньому $37,4 \pm 9,3$ град/хв. Після досягнення мінімального значення відбувався підйом температури внаслідок нагрівання, яке чергується з горизонтальними ділянками, обумовленими структурними змінами у тканині, які пов'язані з розвитком процесів рекристалізації за умов виконання певного температурного балансу та термодинамічної нестабільності системи, успадкованої від етапу охолодження. При цьому у температурному інтервалі -21...0°C за умов НН спостерігалось два типи кривих. Один тип був з вираженою ділянкою підвищення температури, що пов'язана з тепловиділенням при рекристалізації основної маси льоду, що чергувалася з горизонтальною ділянкою, обумовленою тепловиділенням при рекристалізації та теплопоглинанням при плавленні (рис. 7.1, а). Другий тип кривих характеризувався відсутністю цих рис (рис. 7.1, б). Ця нестабільність протікання у зразку процесів, відповідних за наявності рекристалізації може пояснюватися не тільки термодинамічною стабільністю утвореної на етапі охолодження системи, але й обмеженим припливом теплової енергії з навколишнього середовища за умов НН.

За умов КН кількість теплової енергії, що надходить від теплоаплікатора, є достатньою для реалізації почергового відтворення процесів рекристалізації-плавлення (рис. 7.3 та 7.4, горизонтальна ділянка у вказаному інтервалі температур на термограмах). Потрібно відзначити певну повторюваність цієї ділянки за температур 50 та 60°C. За умов КН за температури 40°C повторюваність її була менш стабільною (рис. 7.2)

внаслідок меншої первинної різниці температур тканини та навколишнього середовища (теплоаплікатора).

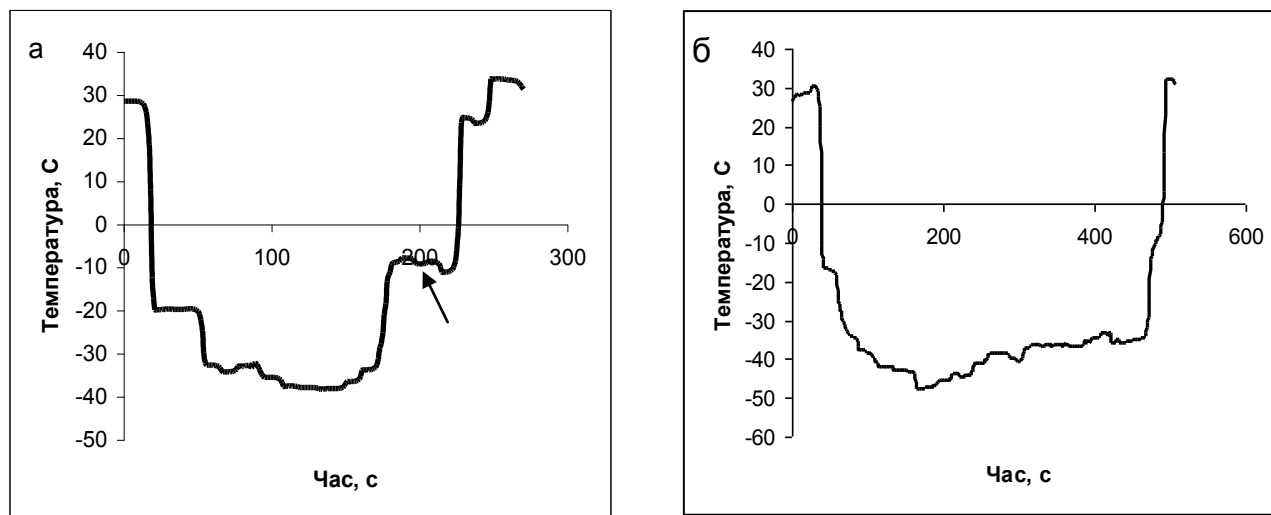
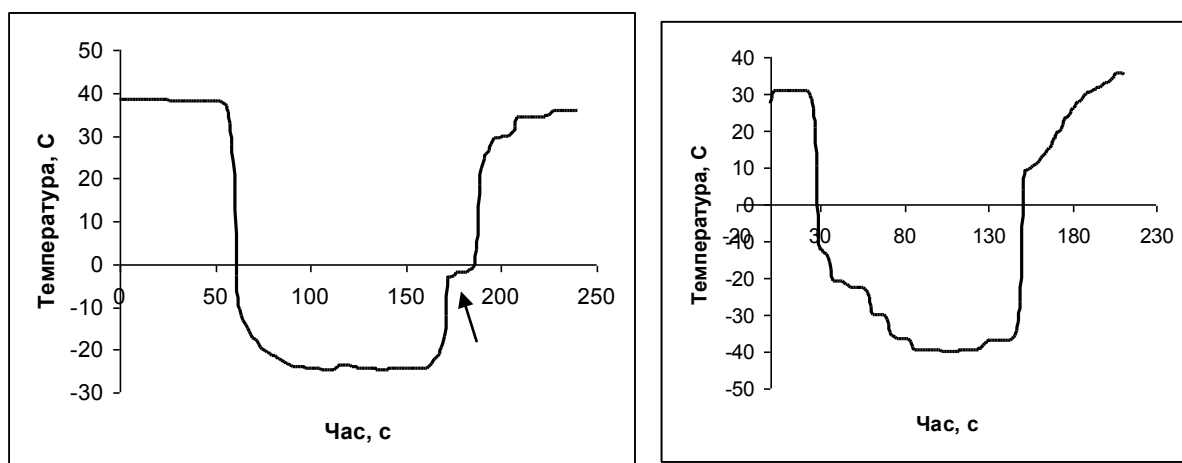


Рис. 7.1. Види термограм охолодження-наігрівання тканини ЩЗ у режимі НН: А – виражена горизонтальна ділянка позначена стрілкою; Б – відсутність ділянки.



А

Б

Рис. 7.2. Види термограм охолодження-наігрівання тканини ЩЗ у режимі КН за температури 40°C: А – виражена горизонтальна ділянка позначена стрілкою; Б – відсутність ділянки.

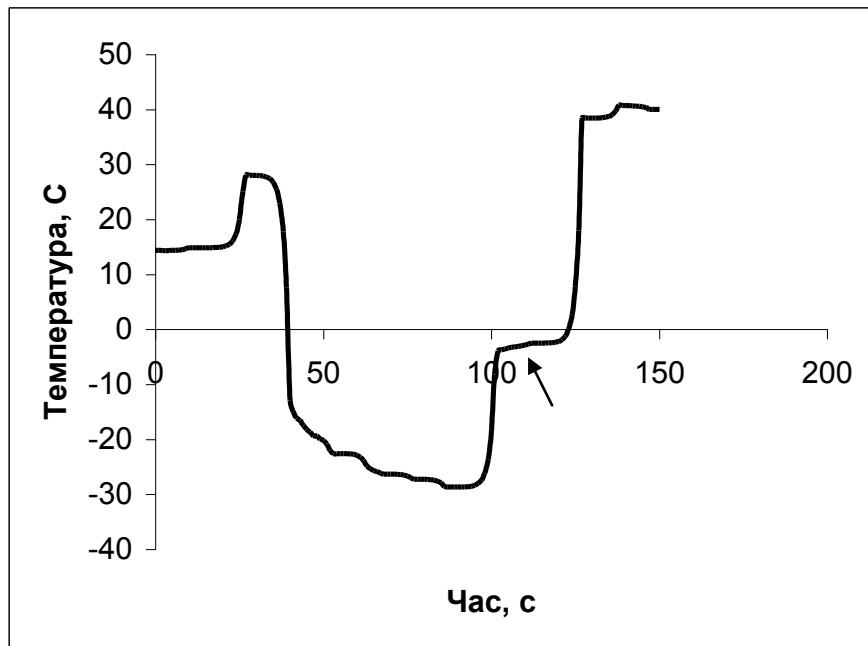


Рис. 7.3. Типовий вид термограм охолодження-нагрівання тканини ЩЗ у режимі КН за температури теплоаплікатора 50°C.

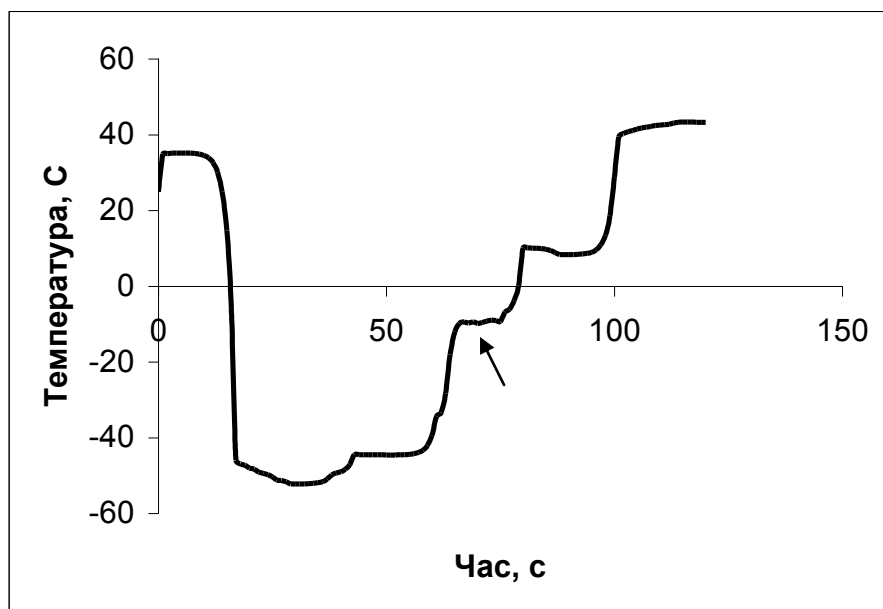


Рис. 7.4. Типовий вид термограм охолодження-нагрівання тканини ЩЗ у режимі КН за температури теплоаплікатора 60°C.

Гістологічний аналіз показав, що у зразках ЩЗ, які зазнали кріодеструкції з використанням НН, спостерігалися фолікули різного розміру, наповнені ацидофільним колоїдом з вакуолями резорбції. Фолікули вистелені кубічним (в фолікулах середнього розміру) і плоским (в великих фолікулах) епітелієм. Сполучнотканинні прошарки, що ділять ЩЗ на дольки, добре виражені. У міжфолікулярній стромі у великій кількості представлені капіляри. У зоні кріовпливу були присутні невеликі ділянки фіброзу, оточені мікрофолікулами та фолікулами неправильної форми (рис. 7.5).

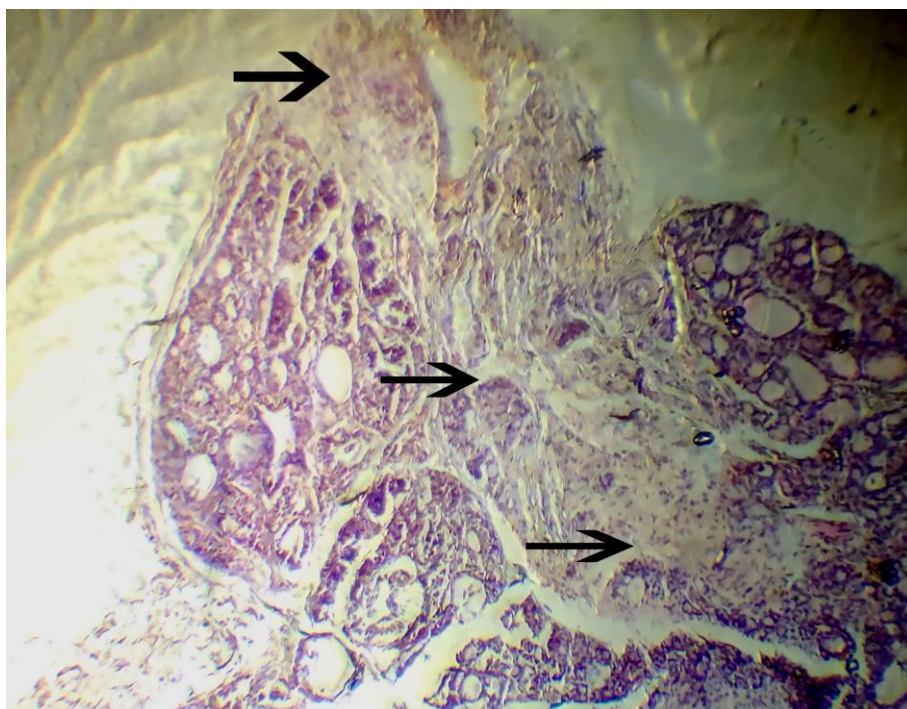


Рис. 7.5. Мікрофотографія зрізу ЩЗ щурів на 21-ту добу після кріодеструкції з використанням НН . Стрілками позначено зону фіброзу конусоподібної форми.

У зразках, які зазнали кріодеструкції з використанням КН, спостерігалися великі вогнища добре васкуляризованої фіброзної тканини. На великих ділянках тканина ЩЗ втрачала характерну часточково-фолікулярну будову та була представлена в основному добре васкуляризованою фіброзною тканиною з вкрапленими поодинокими або

розташованими групами фолікулами невеликого розміру. Фолікули характеризувалися відсутністю колоїду і порушенням епітеліального шару.

Було відмічено, що при використанні КН змінювалася форма зони фіброзу. Якщо при НН зона фіброзу була в основному конусоподібною, то при контрольованому контактному вона поширювалась та набувала форми півкола (Рис. 7.6).

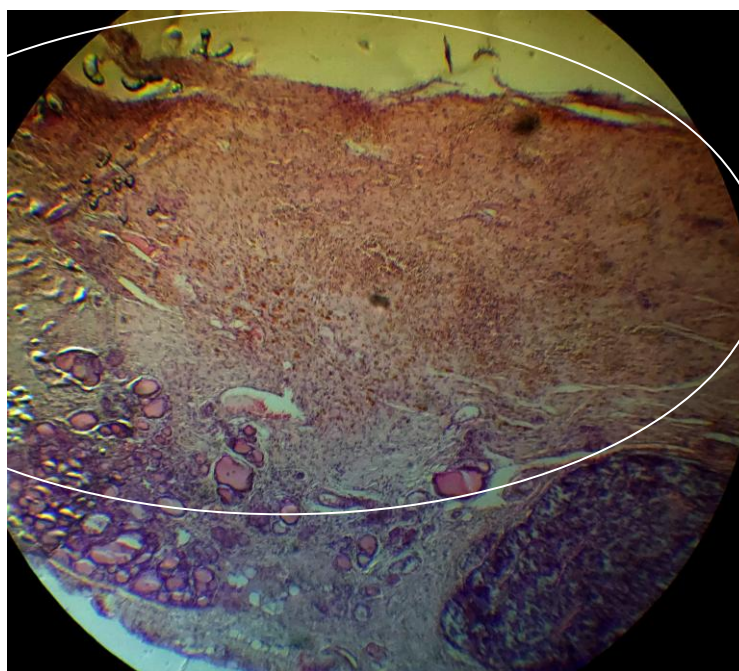


Рис. 7.6. Мікрофотографія зрізу ЩЗ щурів на 21-ту добу після кріодеструкції з використанням КН . Зону фіброзу позначено овалом.

Кількісний аналіз показав, що у використаному режимі кріовпливу показник площі фіброзу був значуще вище у зразках з КН, ніж у зразках, підданих НН (рис. 7.7).

Статистично значуще підвищення середньої площі зони фіброзу було встановлено за умов використання ККН. При цьому підвищення відбувалося у 2,5-3 рази в залежності від зони деструкції. Однак статистично значущої різниці між використаними температурами контактного нагрівання (40, 50 та 60°C) не було встановлено.

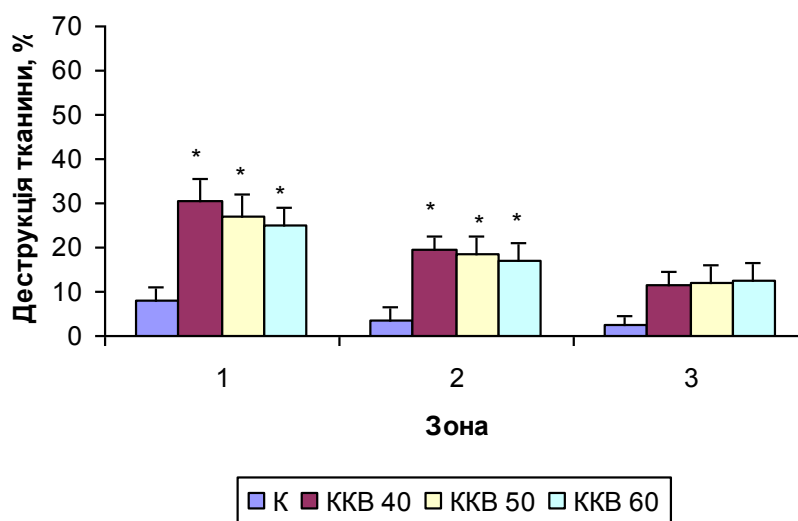


Рис. 7.7. Середня площа фіброзу у гістологічних зразках ЩЗ щурів на 21 добу після кріовпливу та різних способів нагрівання; *- показник значуще різниться в порівнянні з контролем (самонагрівання тканини), $p < 0,05$.

В сучасній практиці існують рекомендації щодо використання під час кріохірургії довільного відігрівання замороженої тканини [110]. Цей підхід ґрунтується на класичних роботах про загальні принципи пошкодження клітин при заморожуванні [103]. Відомо, що швидке нагрівання сприяє виживанню клітин за умов їх кріоконсервування [210, 211]. Тому передбачається, що за умов кріохірургії повільне нагрівання буде посилювати деструкцію тканини. Однак прямих експериментів, в яких був показаний ефект швидкості нагрівання на рівень деструкції тканини у циклі «заморожування-нагрівання» існує замало.

У роботі Gage A. та співав. [212] показано, що ефект кріодеструкції залежить не скільки від швидкості нагрівання, скільки від комбінації швидкостей заморожування/нагрівання та часу витримки тканини за мінімальної температури. Наприклад, результати кріодеструкції у режимах повільного або швидкого нагрівання не відрізняються між собою у тому випадку, якщо на етапі заморожування було використано високу швидкість охолодження та при досягненні цільової температури тканину витримували

протягом деякого часу в інтервалі $-50...-36^{\circ}\text{C}$. У разі, якщо витримки не було, результат швидкого нагрівання був гіршим порівняно з повільним.

Оскільки у наших експериментах було використано високу швидкість охолодження та витримку тканини у температурному інтервалі $-50...-20^{\circ}\text{C}$, швидкість нагрівання мала позитивний ефект.

Таким чином, ефективність кріодеструкції можливо підвищити при використанні контактного нагрівання. Це може пояснюватися тим, що за умов КН до тканини поступає достатня кількість тепла для розвитку рекристалізаційних процесів, тобто цей процес стабільно має місце у кожному зразку, підданому заморожуванню-нагріванню на відміну від ситуації, яка існує у разі НН, де рекристалізація може бути відсутньою. Також важливим є той факт, що у наших експериментах використовували теплоаплікатор більший за діаметром, ніж кріоаплікатор, тобто він перекривав усю зону проморожування тканини. Це додатково сприяло відтворюваності ефекту підсилення кріодеструкції, оскільки КН тканини реалізується на всій зоні проморожування.

Висновки за розділом:

1. Ефективність кріодеструкції в значній мірі залежить від режиму нагрівання. Контактне нагрівання у використаному режимі заморожування-нагрівання (швидкість охолодження в середньому $37,4 \pm 9,3$ град/хв, витримка тканини у температурному інтервалі $-50...-20^{\circ}\text{C}$, початкова температура теплоаплікатора у температурному інтервалі $40...60^{\circ}\text{C}$) призводить до більш виражених деструктивних процесів в тканині ЩЗ порівняно з конвективним нагріванням. При цьому показник деструкції тканини, визначений за середньою площею фіброзу на 21 добу, вище у 2,5-3 рази у тканині ЩЗ, підданій контактному нагріванню, в порівнянні з конвективним.

Публікації за розділом: [36, 37].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Загальною світовою тенденцією є поширення гіпер- та гіпотиреозу, особливо в районах з неблагополучним йодним статусом. Відомо, що обидва порушення функції ЩЗ, як гіпо- так й гіпертиреоз, можуть збільшити ризик виникнення артеріальної гіпертензії. З іншого боку, у великій кількості клінічних досліджень показано, що серед пацієнтів з тиреотоксикозом відзначається превалювання хворих похилого віку, що відносяться до групи ризику по розвитку серцевої патології, які мають попередню артеріальну гіпертензію [62, 70, 213]. При аналізі груп пацієнтів з тиреотоксикозом і супутньої серцевою недостатністю зазначено, що серцево-судинні порушення розвиваються або у пацієнтів з підвищеним системним судинним опором, або у тих пацієнтів, у яких системний судинний опір неадекватно зростає у відповідь на навантаження. Крім того, частота поєднання серцево-судинної та тиреоїдної патології підвищується в зв'язку з тим, що дисбаланс ЛПНЩ, який спостерігається за умов виникнення тиреоїдної патології, є фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань. При тиреоїдній патології, яка існує на фоні серцево-судинних ускладнень, значно підвищується ризик хірургічних втручань, в тому числі ризик кровотечі. Отже комплексні дослідження, спрямовані на вивчення оперативного втручання на ЩЗ на фоні гіпертензії, є актуальними.

Хоча АГ не є незалежним чинником ризику, вона впливає на розвиток серцево-судинних ускладнень при некардіальних оперативних втручаннях. При хірургічних операціях на щитовидній залозі цей ризик невеликий, за сучасними оцінками - близько 1% [214]. Однак при початковій нестабільній гемодинаміці існує ризик інтраопераційного змінення тиску більш, ніж на 20-30 мм рт.ст., що пов'язано з ризиком кровотечі безпосередньо під час операції та віддаленими післяопераційними ускладненнями. Наприклад, згідно з сучасними даними, тиск вище 140 мм рт.ст. протягом операції

асоційовано з підвищенням післяопераційних ускладнень ССС [215]. Взагалі, хірургічні операції з приводу вузлових утворень ЩЗ несуть ризик ускладнень (гіпотиреоз, гіпопаратиреоз, пошкодження гортанного нерву), які спостерігаються у 2-10% прооперованих пацієнтів. Виходячи з цього, зниження тривалості та інвазивності втручання на ЩЗ за рахунок кріоабляції буде позитивним чинником у пацієнтів з АГ. Крім того, кріохірургія має ряд інших переваг, серед яких зниження ризику кровотечі, мінімізація анестезії, оскільки заморожування має знеболюючу дію, «кріоімунологічний» ефект, скорочення часу операції та післяопераційного догляду, низька собівартість та хороший косметичний результат.

За умов розвитку дифузної гіперплазії у ЩЗ відбуваються структурні перебудови, що має відображатися на теплофізичних характеристиках. Отже для вибору тактики проведення кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ актуальним є визначення основних параметрів кріодеструкції (температура заморожування, час експозиції кріоаплікатора, кількість кріовпливів, режим нагрівання) у модельних експериментах. Більш того, ще не накопичено достатньо інформації щодо активності регенераторно-відновлювальних процесів у тиреоїдному залишку після кріоабляції.

Враховуючи вищенаведене, дисертаційна робота була спрямована на встановлення впливу стану АГ на результат кріодеструкції нормальної та патологічно зміненої тканини ЩЗ; визначення режиму кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією на фоні АГ та оптимізацію його шляхом застосування підходів для посилення розвитку процесів рекристалізації; вивчення швидкості репаративних процесів у тиреоїдному залишку після кріодеструкції тканини ЩЗ у порівнянні з резекцією.

Оскільки на теперішній час не було спроби використати для моделювання дифузної гіперплазії ЩЗ спонтанно-гіпертензивних щурів лінії SHR, на першому етапі роботи необхідним було вивчити специфічний та системний вплив індуктора ПТУ на цих тварин для оцінки адекватності

обраної моделі. У рамках вирішення цього завдання було проаналізовано динаміку морфологічних показників ЩЗ, рівню ТТГ та тиреоїдних гормонів, морфологічних характеристики нирок, печінки, селезінки, серця та біохімічних показників крові (АЛТ, АСТ, сечовини, білірубін, креатинін) на різних термінах введення ПТУ. Визначити вплив гіпертензивного стану на цей процес можливо було при залученні у якості контролю щурів Вістар, оскільки лінія SHR була отримана з них за допомогою селективного інбридингу [21].

За макроскопічною оцінкою, встановлено збільшення розміру та маси ЩЗ у щурів обох ліній. Наприкінці терміну експерименту (47 доба прийому ПТУ) маса ЩЗ щурів зростала в 5,3 рази для SHR та 5,1 рази для Вістар. Ці дані збігаються з результатами інших авторів, які також встановили зростання маси ЩЗ на тлі прийому ПТУ [183, 216]. Мікроскопічно у щурів на фоні прийому ПТУ виявлені характерні патоморфологічні зміни ЩЗ у вигляді фолікулів, вистелених призматичним епітелієм; фолікулів без колоїдного вмісту; фолікулів з багатошаровим епітелієм; великих фолікулів з розвитком сосочкової проліферації епітелію. Проліферація інтрафолікулярного епітелію ЩЗ з утворенням внутрішньофолікулярних сосочкових структур і ознаки гіперемії в стромі органу також були виявлені іншими авторами при введенні щурам, мишам, вівцям тіосечовини та її похідних, до яких відноситься ПТУ [217–219]. Автори пояснюють дані зміни стимуляцією проліферативної активності фолікулярного епітелію на тлі низького рівня Т4 і підвищеного рівня ТТГ. Внаслідок активного ділення клітин епітелію утворюються проекції в просвіт фолікула (сосочки). Просвіт фолікула при цьому набуває неправильну звиту форму або відсутній зовсім.

Морфометричний аналіз встановив статистично значуще підвищення ВФЕ, ЯЦВ тироцитів, кількості фолікулів з розвитком сосочкової проліферації; та активацію проліферації фібробластів. При цьому у щурів лінії SHR показники ВФЕ і кількості патологічних фолікулів були статистично вище в порівнянні з щурами Вістар. Відомо, що ПТУ-індукована

гіперплазія ЩЗ пов'язана зі збільшенням на тироцитах рецепторів до інсуліноподібного фактору росту IGF II типу [19], які опосередковують дію ТТГ. Гіпертрофічні процеси під дією ПТУ пов'язані як зі збільшенням розміру фолікулярних клітин, так й з активацією продукції тироглобуліну, яка була продемонстрована при введенні ПТУ щурам [185]. Вірогідно, гіпертензивні щури мають генетично детерміновані властивості, які приводять до більш активної реалізації механізму гіперпластичних змін у тканині ЩЗ.

Нами було досліджено вплив ПТУ на морфологічні показники серця, селезінки, печінки та нирок, а також деякі показники крові гіпертензивних щурів на різних термінах від початку прийому препарату. Були встановлені системні ефекти на серце, селезінку та печінку щурів у вигляді венозних застійних явищ. Прийом ПТУ призводив до порушення коронарного кровообігу і розвитку дистрофічних процесів в міокарді щурів, які проявлялися зменшенням площі кардіоміоцитів, пікнозом їх ядер, зниженням щільності кардіоміоцитів і збільшенням обсягу сполучної тканини. Було виявлено гепатотоксичність ПТУ, яка виражалася в патологічних змінах гістологічної структури печінки, венозної гіперемії і зростанні рівнів амінотрансфераз. Попередні дослідження також виявляли при введенні ПТУ венозну гіперемію ЩЗ, легенів, печінки, селезінки, шкіри [217, 219, 220]. Механізм, за допомогою якого ПТУ викликає васкуліт і крововилив, на теперішній час до кінця не ясний, проте відомо про провідну роль аутоімунних процесів в патогенезі даного ускладнення [220].

Як відомо, відтік венозної крові з непарних органів черевної порожнини відбувається по портальній вені в печінку, тому портальна гіпертензія, що є характерною для тварин лінії SHR [221], сприяє підвищенню венозного та інтраспленального мікроваскулярного тиску, венозному повнокров'ю та акумуляції екстравазальної рідини в червоній пульпі селезінці [222]. Ймовірно, введення ПТУ може посилювати патологічні зміни у селезінці. Зміна середньої площі венозних синусів є

гістологічною ознакою патологічних процесів селезінки [223]. В нашому експерименті на фоні прийому 0,1% ПТУ цей показник також зазнав збільшення.

Як було встановлено раніше, характерними ознаками вікового ремоделювання міокарда щурів лінії SHR є гіпертрофія (збільшення площі цитоплазми та ядра кардіоміоцитів), а також зменшення щільності кардіоміоцитів в порівнянні з нормотензивними тваринами [189, 224]. Гіпертрофія міокарда у щурів даної лінії, що досягає 30%-го збільшення маси серця, виникає як компенсаторна відповідь на постійне підвищення системного артеріального тиску [225]. Крім того, як правило, у щурів лінії SHR виявляються зміни нормальної архітекτονіки міокарда у вигляді зон замісного фіброзу на місці втрачених кардіоміоцитів [226].

У процесі роботи нами було встановлено, що застосування ПТУ різноспрямовано впливало на гістологічні характеристики міокарда щурів лінії SHR. На початкових термінах прийому ПТУ в міокарді розвивалися дистрофічні процеси, які проявлялися зменшенням площі кардіоміоцитів. Однак при прийомі ПТУ не більше місяця дані зміни не виходили за рамки показників кардіоміоцитів нормотензивних щурів [224]. Більш тривалий прийом ПТУ проявлявся в подальшому зменшенні площі цитоплазми та пікнозі ядер кардіоміоцитів. Наростання дистрофічних змін супроводжувалося збільшенням обсягу сполучної тканини з досягненням максимального значення на 47 добу прийому ПТУ. Це свідчило про те, що втрата кардіоміоцитів внаслідок прийому ПТУ стимулювала проліферацію фіброblastів, що призводило до появи великих зон міокардіального фіброзу.

Прийом ПТУ також приводив до повнокров'я судин і капілярів, венозного застою і розширення просвіту вен і капілярів. Оскільки АГ сама по собі супроводжується підвищенням судинної проникності [227], встановлені ПТУ-індуковані порушення кровообігу несуть ризик появи периваскулярного набряку, розвитку серцевої недостатності через дегенеративно-дистрофічні зміни, порушення трофіки і ішемію міокарда.

В цілому, щури лінії SHR виявилися більш чутливими до тиреостатичної та гепатотоксичної дії ПТУ, ніж щури Вістар, що проявлялося в статистично значущому збільшенні показників ВФЕ, кількості патологічних фолікулів з сосочковими структурами, площі перерізу центральної вени печінкових часточок і рівнів амінотрансфераз крові.

Таким чином, експериментально було підтверджено адекватність обраної моделі та встановлені терміни розвитку патоморфологічних змін у тканині ЩЗ спонтанно-гіпертензивних тварин за умов індукції дифузної гіперплазії шляхом введення ПТУ.

Глибокі зміни у структурі тканини ЩЗ повинні були вплинути на характеристики тканини, які є важливими для досягнення цільових результатів кріодеструкції. Для перевірки цього припущення нами було проведено порівняльну оцінку температурних змін в процесі кріовпливу на тканину ЩЗ в нормі та за умов дифузної гіперплазії. При цьому не було знайдено відмінностей у температурних кривих, зафіксованих у «зоні проморожування» згідно класифікації трьох зон кріоушкодження [117, 118]. Однак при аналізі кривих охолодження у «зоні охолодження» було отримано результати, які свідчили про відмінності теплофізичних характеристик інтактної та патологічно зміненої під дією ПТУ тканини ЩЗ. Виявилось, що ПТУ-індукована дифузна гіперплазія тканини характеризувалася двократним збільшенням довжини ділянки на кривій охолодження, яка обумовлена взаємною компенсацією холодового впливу кріоаплікатору на тканину та питомої теплоти кристалоутворення, що виділяється в процесі заморожування (для інтактної тканини – 22,0 (17,0; 27,0) с; для тканини з

дифузною гіперплазією – 52,0 (48,0; 56,0) с). Тобто для обраного типу кріоаплікатора та його конфігурації при однакових вихідних умовах у разі ЩЗ з дифузною гіперплазією для підсилення кріоушкодження тканини за рахунок процесів, які спостерігаються у «зоні охолодження» [117, 118], експозиція кріоаплікатору має бути підвищена в середньому у два рази.

При аналізі гістопатологічних змін тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією, підданою кріоабляції, було встановлено, що на 21 добу після кріовпливу формується добре помітна зона фіброзу конусоподібної форми. В зоні була відсутня характерна для ЩЗ часточкова-фолікулярна будова. Паренхіма залози заміщена сполучною тканиною з вираженою васкуляризацією та незначною лімфоцитарно-гістіоцитарною інфільтрацією. На периферії зони, рідше – у центрі, спостерігалися поодинокі мікрофолікули або їх скупчення.

Для оцінки об'єму деструкції тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією було обрано 2 режими: №1 – одноразовий кріовплив з експозицією кріоаплікатора протягом 60 с; №2 – дворазовий кріовплив з експозицією кріоаплікатора протягом 120 с кожне. Потрібно відзначити, що вибір режимів для випробування базувався на результатах, отриманих раніше на ЩЗ другими авторами. В роботі Pomorski L. і співавт. в експериментах на нормальній тканині ЩЗ щурів використовували 2 послідовних кріовпливу з експозицією 60 та 45 с [194, 195]. При кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ людини був використаний одноразовий кріовплив впродовж 60 с в роботі [168]. За умов черезшкірної кріодеструкції зоба ЩЗ Named M. і співавт використовували 3-кратний кріовплив, кожний тривалістю по 180 с [170].

У нашій роботі встановлено, що одноразовий кріовплив на ЩЗ з дифузною гіперплазією при експозиції кріоаплікатору впродовж 60 с призводить до деструкції тканини на глибину не більше 0,3 мм. Збільшення часу експозиції до 120 с та кількості кріовпливів до 2-х приводило до більш вагомого результату: кріодеструкція тканини ЩЗ спостерігалася на глибину більше 1 мм. При цьому зазначений інтервал часу експозиції кріоаплікатора

(120 с) дозволяв досягти цільові значення температури (-20°C та нижче) в «зоні проморожування», тоді як в зоні, прилеглій до життєво-важливих структур (трахеї), спостерігалася короткочасна гіпотермія, яка не має значного пошкоджуючого ефекту.

Метою наступного етапу роботи була оцінка впливу стану АГ на результат кріодеструкції тканини ЩЗ. Для цього у серійних гістологічних зрізах ЩЗ вимірювали площу зони фіброзу, сформованої на 21-добу після кріовпливу. Дослідження було проведено в порівняльному аспекті у групах спонтанно-гіпертензивних та нормотензивних щурів, інтактних та з ПТУ-індукованою гіперплазією.

В результаті експериментів визначено, що кріовплив у обраному режимі не приводив до значущих змін показника у гіпер- та нормотензивних тварин інтактних груп. Однак статистично значуще зменшення зони фіброзу у щурів обох ліній спостерігалось у зразках з ПТУ-індукованою гіперплазією ЩЗ. При цьому, у щурів лінії SHR показник площі фіброзу був меншим в порівнянні з щурами Вістар (значуще зменшення показників $Sf_{\min}$ (на 60,9%) та $Sf_{\max}$ (на 42,1%), та тенденція до зменшення Sf_{med} (на 44,7%)). Це свідчило про те, що тканина ЩЗ з ПТУ-індукованою гіперплазією у гіпертензивних щурів є більш стійкою до кріоабляції порівняно з такими ж тваринами нормотензивної групи.

Таким чином, було встановлено, що сама по собі артеріальна гіпертензія не впливає на результат кріодеструкції ЩЗ. Однак після маніфестації ПТУ-індукованих патологічних змін спостерігається підвищення кріостійкості тканини ЩЗ. Цей факт може пояснюватися тим, що ЩЗ щурів лінії SHR є більш чутливою до дії ПТУ та у більшій мірі набуває патологічних змін.

Метою наступного етапу роботи була оцінка активності процесів репаративної регенерації після кріодеструкції ЩЗ з ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією у щурів лінії SHR. Вивчення гістологічних, імуногістохімічних характеристик тканини ЩЗ та рівнів ТТГ, Т3, Т4 було проведено в порівняльному аспекті після кріодеструкції та резекції.

Відновлення нормального рівню тиреоїдних гормонів та ТТГ є ознакою регенераційних процесів у ЩЗ. Нами було встановлено значуще збільшення рівня ТТГ у щурів обох експериментальних груп тільки через 30 діб після операції. На 60-ту і 120-ту добу ці відмінності нівелювалися, що свідчило про активне протікання репаративно-відновлювальних процесів у ЩЗ на цих термінах. Рівень вільних Т3 та Т4 статистично значуще не відрізнявся у щурів різних груп на досліджених термінах.

Аналіз гістологічних ознак регенеративних процесів у ЩЗ (збільшення ВФЕ, підвищення кількості С-клітин, ІФО, ФНФ та кількості Ki-67-позитивних клітин) на 30-ту добу у тварин з резекцією або кріодеструкцією показав статистично значуще збільшення усіх показників за виключенням ВФЕ.

При порівнянні кількісних ознак регенеративних процесів між групами з кріодеструкцією та резекцією, було відзначено статистично значуще збільшення кількості С-клітин (кріодеструкція – 78,0 (61,3; 91,9); резекція – 106,3 (100,4; 117,2)) та ІФО (кріодеструкція – 5,0 (4,4; 5,3); резекція – 7,5 (7,2; 8,1)) у групі тварин з резекцією. Кількість Ki-67-позитивних клітин у тиреоїдному залишку на 30-ту добу після резекції була значуще вище у 1,5 рази порівняно з групою тварин після кріодеструкції. На 60-ту добу така тенденція зберігалася, але значення показника зменшувалися у обох випадках.

Таким чином, як після резекції, так й після кріодеструкції в тиреоїдному залишку спостерігається комплекс гістоморфологічних змін, характерних для процесів репаративної регенерації ЩЗ. При цьому процеси неоплікулогенезу після кріодеструкції протікали менш активно, ніж після резекції. Ці дані узгоджуються з результатами, отриманими Македонською В.А. і співавт., про те, що інтраопераційний кріовплив за умов хірургічного лікування дифузного токсичного зобу уповільнює регенерацію кукси ЩЗ [228].

Відомо, що щитоподібна залоза відноситься до числа органів, які на часткову тиреоїдектомію реагують гіпертрофією та гіперплазією клітин [14–16, 203]. Обсяг вилюченої тканини ЩЗ повинен бути достатній для того, щоб активізувалися процеси проліферації клітин і утворення нових фолікулів. В роботі Ozaki T. і співавт. [14] було показано, що після резекції 1 цілої та 2/5 частки ЩЗ миші кількість мікрофоллікулів через два тижні помітно збільшилася як в центральній частині тиреоїдного залишку, так і на краю резекції. Автори прийшли до висновку, що центральна частина тканини ЩЗ, що залишилася, є центром проліферації, яка пізніше поширюється й на периферію. При цьому рівень Т4 наближався до контрольних значень вже через 14 днів після операції.

При гемітиреоїдектомії у щурів у залишку ЩЗ протягом 2 місяців спостерігається збільшення ВФЕ, кількості ФНФ і митозів [203]. У дослідженнях Okamoto M. і співавт. після часткової тиреоїдектомії у мишей було виявлено більшу кількість ФНФ, а в складі тиреоїдного епітелію різко збільшувалася кількість війчастих клітин [15].

Механізм фолликулогенеза ЩЗ, вивчений Toda S. і співавт. [229], може реалізуватися кількома різними шляхами. Утворення нових фолікулів можливо шляхом брунькування від материнського фолікулу. Інший спосіб полягає в появі щільних ІФО, в яких пізніше в результаті апоптозу центрально-розташованих клітин утворюються порожнини, заповнені колоїдом.

Базуючись на отриманих нами даних, процеси неофолікулогенезу у тканині ЩЗ протікають менш активно після кріодеструкції, ніж після резекції. Можливо, це пов'язано з розвитком процесів апоптозу і некрозу в тканині після оперативного втручання. Як при резекції, так і при кріоабляції тканини внаслідок загибелі клітин спостерігається вивільнення ендогенних продуктів, так званих DAMPs і CDAMPs (молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням і загибеллю клітин) [230]. Вони діють як прямі медіатори запалення і активують у тканині всі етапи процесу ранозагоєння, в тому числі

й репарацію та ремоделювання. При цьому, у разі резекції основна маса клітин гине шляхом некрозу від прямих пошкоджень або внаслідок ішемії-реперфузії. За умов кріоабляції, як було встановлено раніше [11, 110], значна частина клітин гине шляхом апоптозу. Відомо, що апоптозні клітини зберігають цілісність своєї плазматичної мембрани і швидко елімінуються фагоцитами без активації запальної реакції. Активність запальної реакції буде тим більше, чим більше викид медіаторів запалення, а, значить, й більш активно йтимуть процеси репарації. Вірогідно, при кріоабляції процеси апоптозу переважають над процесами некрозу, і тому відбувається менша цитокінова стимуляція, отже швидкість регенеративних процесів не така висока, як у разі резекції.

Як відомо, пошкодження біооб'єкту за умов кріоконсервування відбувається не тільки на етапі заморожування, але при його нагріванні у температурних інтервалах, де відбуваються процеси рекристалізації [110, 120, 207]. Інтенсивність рекристалізаційних процесів тим більше, чим вище була швидкість охолодження на етапі заморожування, тобто чим більш термодинамічно нестійка структура була сформована при заморожуванні [208].

Виходячи з цього, на наступному етапі роботи було вивчено вплив контрольованого нагрівання на результат кріодеструкції тканини ЩЗ з дифузною гіперплазією. Для цього після кріодеструкції у обраному режимі здійснювали нагрівання тканини ЩЗ за двома способами: 1) пасивне неконтрольоване нагрівання (НН), при якому тканина нагрівалася за рахунок теплообміну з навколишнім середовищем; 2) активне контактне нагрівання (КН), при якому до місця кріовпливу прикладали мідний аплікатор (теплоаплікатор), нагрітий до температур 40, 50 і 60°C. Важливо відзначити, що теплоаплікатор був більший за діаметром, ніж кріоаплікатор. Теплоаплікатор прибирали, коли температура досягала 28-30°C. Через 21 добу тварин виводили з експерименту, ЩЗ піддавали гістологічному аналізу.

Було відмічено, що при використанні КН змінювалася форма зони фіброзу. Якщо при НН зона фіброзу була конусоподібною, то при КН вона поширювалась та набувала форми півкола. Цей ефект можна пояснити тим, що використаний нами контактний теплоаплікатор перекривав зону проморожування (наконечник кріоаплікатора – 1,5 мм, зона проморожування – близько 3-4 мм, наконечник теплоаплікатора – 5 мм). Ймовірно, це сприяло реалізації ефекту кріодеструкції тканини за рахунок підсилення процесу рекристалізації на всій зоні проморожування, особливо у поверхневих шарах, тому зона фіброзу розширювалася і набувала форму півкола.

Статистично значуще підвищення у 2,5-3 рази середньої площі зони фіброзу було встановлено за умов використання КН порівняно з НН. Однак статистично значущої різниці між використаними температурами контактного нагрівання (40, 50 та 60°C) не було встановлено.

Таким чином, за умов використаного режиму заморожування-нагрівання тканини ЩЗ (швидкість охолодження в середньому $37,4 \pm 9,3$ град/хв, витримка тканини у температурному інтервалі -50...-20°C) та за використаного типу та конфігурації кріоаплікатора ефективність кріодеструкції може бути підвищено за рахунок використання активного контактного нагрівання (початкова температура теплоаплікатора у температурному інтервалі 40...60°C).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукового завдання, спрямованого на встановлення впливу стану артеріальної гіпертензії на результат кріодеструкції нормальної та патологічно зміненої тканини щитоподібної залози; визначення режиму кріодеструкції щитоподібної залози з дифузною гіперплазією та оптимізацію його шляхом застосування підходів для посилення розвитку процесів рекристалізації на етапі нагрівання; вивчення швидкості репаративних процесів у тиреоїдному залишку після кріодеструкції.

1. Для створення коректної моделі дифузної гіперплазії щитоподібної залози на фоні артеріальної гіпертензії було вивчено специфічну дію антитиреоїдного препарату пропілтіоурацилу у спонтанно-гіпертензивних щурів лінії SHR. Патоморфологічні зміни тканини ЩЗ спонтанно-гіпертензивних тварин за умов введення 0,1% ПТУ протягом 47 діб виражалися у загальному підвищенні маси органу в середньому у 5,3 рази; збільшенні висоти фолікулярного епітелію на $75,5 \pm 4,3\%$, площі фолікулів на $9,1 \pm 2,3\%$, ядерно-цитоплазматичного відношення тироцитів на $39 \pm 5,4\%$, появі патологічних фолікулів з сосочковими структурами та активації проліферації фібробластів у стромі органу.

2. На основі морфометричного аналізу патоморфологічних характеристик різних органів (серця, нирки, селезінки, печінки) та біохімічних показників крові (АЛТ, АСТ, сечовини, білірубін, креатинін) встановлено системний вплив антитиреоїдного препарату пропілтіоурацилу на спонтанно-гіпертензивних щурів лінії SHR. Він виражався у порушенні коронарного кровообігу та розвитку дистрофічних процесів в міокарді (зменшенні площі кардіоміоцитів, пікнозні ядра, зниженні щільності кардіоміоцитів і збільшенні обсягу сполучної тканини); підвищенні середньої

площі перерізу центральної артерії, трабекулярних вен та загальної площі венозних синусів селезінки за рахунок розширення просвіту судин та венозного повнокров'я; патологічних змінах гістологічної структури печінки, венозній гіперемії та зростанні рівнів амінотрансфераз.

3. Стан, що характеризується підвищеним рівнем артеріального тиску, значуще не впливає на результат кріодеструкції щитоподібної залози щурів. Однак після маніфестації патологічних змін, характерних для дифузної гіперплазії, спостерігається підвищення стійкості тканини щитоподібної залози до кріодеструкції.

4. У результаті порівняльного вивчення температурних змін у зонах проморожування та охолодження були встановлені відмінності між термограмами інтактної та патологічно зміненої під дією ПТУ тканини щитоподібної залози, які характеризувалися збільшенням довжини ділянки на кривій охолодження, яка обумовлена взаємною компенсацією холодового впливу кріоаплікатору на тканину та питомої теплоти кристалоутворення, що виділяється в процесі заморожування (інтактна тканина – 22,0 (17,0; 27,0) с; тканина з дифузною гіперплазією – 52,0 (48,0; 56,0) с). Таким чином, для обраного типу кріоаплікатора та його конфігурації підвищення ступеню деструкції тканини щитоподібної залози з дифузною гіперплазією у зоні охолодження можливе за рахунок збільшення експозиції кріоаплікатора в середньому у два рази.

5. Встановлено, що режим, який включає експозицію кріоаплікатора впродовж 120 с та дворазовий кріовплив, призведе до руйнування тканини щитоподібної залози з дифузною гіперплазією у гіпертензивних щурів на глибину $1156,5 \pm 185,7$ мкм, у ширину на $812,5 \pm 189$ мкм. При цьому зазначений інтервал часу експозиції кріоаплікатора дозволяє досягти цільові значення температури (-20°C та нижче) в зоні проморожування, тоді як у прилеглих зонах не спостерігається температурного впливу, здатного привести до незворотного пошкодження життєво-важливих структур (трахеї).

6. Порівняльний аналіз комплексу показників (гістологічних ознак регенерації, імуногістохімічного визначення маркеру клітинної проліферації Ki-67, біохімічних показників рівню тиреоїдних гормонів та ТТГ) показав, що стимуляція процесів репаративної регенерації відбувається у тканині щитоподібної залози щурів на термінах 30, 60 та 120 діб як після кріодеструкції, так й після резекції. При цьому процеси неофолікулогенезу у тиреоїдному залишку протікають більш активно після резекції, ніж після кріодеструкції, про що свідчать статистично значуще збільшення кількості С-клітин у 1,4 рази, інтерфолікулярних острівців та Ki-67-позитивних клітин у 1,5 рази після резекції в порівнянні з кріодеструкцією.

7. За умов використаного режиму заморожування-нагрівання тканини щитоподібної залози з дифузною гіперплазією (швидкість охолодження в середньому $37,4 \pm 9,3$ град/хв, витримка тканини у температурному інтервалі -50...-20°C) та за використаного типу та конфігурації кріоаплікатора ефективність кріодеструкції може бути підвищена за рахунок використання контактного нагрівання (початкова температура теплоаплікатора у температурному інтервалі 40-60°C, площа теплоаплікатора більша за площу зони проморожування). При цьому контактне нагрівання призводить до підвищення у 2,5-3 рази площі зони фіброзу у тканині щитоподібної залози в порівнянні зі звичайним конвективним способом нагрівання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, Gutierrez-Buey G, Lazarus JH, Dayan CM, Okosieme OE. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(5): 301-316. DOI: 10.1038/nrendo.2018.18
2. Пашковська НВ. Лікування гіпотиреозу згідно із сучасними клінічними настановами. *Международный эндокринологический журнал*. 2016; 6(78): 48-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0721.6.78.2016.81860>
3. Кравчун НА. Гипертиреоз: клиника, диагностика, терапия. *Острые и неотложные состояния в практике врача*. 2013; 6 (37) С.5-9.
4. Berta E, Lengyel I, Halmi S, et al. Hypertension in Thyroid Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 482. DOI: 10.3389/fendo.2019.00482;
5. Cappola AR, Ladenson PW. Hypothyroidism and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 2438–2444. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030398>
6. Prisant LM, Gujral JS, Mulloy AL. Hyperthyroidism: a secondary cause of isolated systolic hypertension. *J Clin Hypertens*. 2006; 8: 596–9. DOI:10.1111/j.1524-6175.2006.05180.x
7. Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, et al. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients. *Langenbecks Arch Surg*. 2008; 393 (5): 667-73. <https://doi.org/10.1007/s00423-008-0366-7>
8. Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J Vasc Interv Radiol*. 2010; 21 (8 Suppl): S187-91. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2009.12.403>
9. Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses.

Cryobiology.2009;58(1):1-11.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.10.126>;

- 10.Aarts BM, Klompenhouwer EG, Rice SL, Imani F, Baetens T, Bex A, Horenblas S, Kok M, Haanen JBAG, Beets-Tan RGH, Gómez FM. Cryoablation and immunotherapy: an overview of evidence on its synergy. *Insights Imaging*. 2019;10(1): 53. DOI:10.1186/s13244-019-0727-5
- 11.Gage AA, Baust JG. Cryosurgery - a review of recent advances and current issues. *Cryo Letters*. 2002; 23(2): 69-78.
- 12.Grange R, Tradi F, Izaaryene J, Daidj N, Brunelle S, Walz J, Gravis G, Piana G. Computed tomography-guided percutaneous cryoablation of T1b renal tumors: safety, functional and oncological outcomes. *Int J Hyperthermia*. 2019; 36(1): 1065-1071. DOI:10.1080/02656736.2019.1675913. PMID: 31648584
- 13.Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 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. *Thyroid*. 2016; 26(1): 1-133. DOI:10.1089/thy.2015.0020
- 14.Ozaki T, Matsubara T, Seo D, Okamoto M, Nagashima K, Sasaki Y, Hayase S, Murata T, Liao XH, Hanson J, Rodriguez-Canales J, Thorgeirsson SS, Kakudo K, Refetoff S, Kimura S. Thyroid regeneration: characterization of clear cells after partial thyroidectomy. *Endocrinology*. 2012; 153(5): 2514-25. DOI: 10.1210/en.2011-1365.
- 15.Okamoto M, Hayase S, Miyakoshi M, Murata T, Kimura S. Stem cell antigen 1-positive mesenchymal cells are the origin of follicular cells during thyroid regeneration. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080801>
16. Kimura S. Thyroid regeneration: how stem cells play a role? *Front Endocrinol(Lausanne)*.2014;5:55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00055>

17. Ковалева МВ., Афонин ВЮ. Особенности физиолого-биохимических свойств крыс линии SHR в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2014; 58 (6): 89-92;
18. Garcia Diaz AI, Moyon B, Coan PM, Alfazema N, Venda L, Woollard K, Aitman T. New Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat transgenic models with ubiquitous expression of green fluorescent protein. *Dis Model Mech*. 2016; 9(4): 463-71. DOI: [10.1242/dmm.024208](https://doi.org/10.1242/dmm.024208).
19. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Gene.t*. 1999; 21 (1): 76-83. DOI: [10.1038/5013](https://doi.org/10.1038/5013).
20. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, et al. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995; 91(1): 161-170. DOI: [10.1161/01.cir.91.1.161](https://doi.org/10.1161/01.cir.91.1.161).
21. Bianchi G, Fox U, Imbasciati E. The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats *Life Sci*. 1974; 14(2): 339-347. DOI: [10.1016/0024-3205\(74\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(74)90064-2).
22. Побеленский КО, Побеленская ЛА, Легач ЕИ, Побеленский ОН Сравнительное изучение результатов резекции и криодеструкции щитовидной железы в эксперименте. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020; Вип.2 (156): 286-289. DOI: [10.29254/2077-4214-2020-2-156-286-289](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-2-156-286-289)
23. Побеленський КО, Легач ЄІ. Віддалені результати криодеструкції щитовидної залози у щурів із моделлю дифузної гіперплазії. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2020; 30 (3): 285. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.285>

24. Побеленський КО, Колот НВ, Проценко ОС, Падалко ВІ, Божок ГА, Легач ЄІ, Побеленський ОМ. Динаміка морфологічних показників щитовидної залози у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. *Morphologia*. 2019; 13(3): 93-98. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.93-98>
25. Побеленський КО, Легач ЄІ, Побеленський ОМ, Побеленська ЛА, Бондаренко ТП. Вивчення впливу пропілтіоурацилу на морфологічні характеристики тканини щитовидної залози щурів лінії SHR. *Матеріали VI з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом*, Яремча, 18-21 червня 2019, с. 59.
26. Побеленський КО, Побеленська ЛА, Шерстюк СО, Побеленський ОМ. Морфологічні зміни фолікулярного епітелію щитоподібної залози при використанні пропілтіоурацилу у гіпертензивних щурів лінії SHR. *Актуальні питання сучасної медицини. Тези доповідей*. 2020; с. 196-197.
27. Побеленский КО, Легач ЕИ, Божок ГА. Влияние пропилтиоурацила на некоторые морфологические характеристики щитовидной железы гипертензивных крыс линии SHR. *Тези конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI ст.»*, Одеса, 19-20 квітня 2019; с. 104-105.
28. Побеленський КО, Олефіренко ОО, Побеленський ОМ, Легач ЄІ, Побеленська ЛА. Порівняльні результати кріодеструкції щитовидної залози у щурів лінії SHR та Вістар. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна серія медицина*. 2020; Вип. 40: 70-79.
29. Побеленский КО, Легач ЕИ, Побеленский ОН, Побеленская ЛА. Биохимические показатели крови и морфологические характеристики щитовидной железы, почки и печени нормотензивных и гипертензивных крыс на фоне введения пропилтиоурацила. *Проблеми ендокринної патології*. 2020; №2(72): 111-118. <https://doi.org/10.21856/j-per.2020.2.14>

30. Pobelensky KO, Kolot NV, Protsenko ES, Legach EI, Bozok GA. Morphological parameters of the myocardium in spontaneously hypertensive rats upon administration of propylthiouracil. *Recent Adv Biol Med.* 2021; 7 (3): 1-3. Available from: <https://rabm.scholasticahq.com/article/27329-morphological-parameters-of-the-myocardium-in-spontaneously-hypertensive-rats-upon-administration-of-propylthiouracil>
31. Проценко ОС, Колот НВ, Побеленський КО, Побеленський ОМ, Падалко ВІ, Шаповал ОВ, Божок ГА, Легач ЄІ. Морфологічні зміни нирок у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. *Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології»*. Дніпро, 9-11 жовтня 2019; с. 113-115.
32. Побеленський КО, Колот НВ, Побеленська ЛА. Вплив пропілтіоурацилу на кровообіг селезінки у щурів з артеріальною гіпертензією. *Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 25-ї річниці заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна*, Харків, 22-23 квітня 2021; с. 129-131.
33. Побеленський КО, Пахомов ОВ, Гуріна ТМ, Побеленська ЛА, Легач ЄІ, Божок ГА. Експериментальна кріодеструкція щитовидної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією. *Проблеми кріобіології і кріомедицини.* 2021; 31(2): 168-179. DOI: doi.org/10.15407/cryo31.02.168
34. Побеленський КО. Гістопатологічні характеристики тканини щитоподібної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією після кріодеструкції. *Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 215-ї річниці заснування медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна*, Харків, 26-27 березня 2020; с. 195-196.

35. Побеленский КО, Легач ЕИ, Побеленский ОН, Побеленская ЛА. Гистопатологические характеристики ткани щитовидной железы крыс после криовоздействия. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2019; 29(2): 188. <https://doi.org/10.15407/cryo29.02.188>
36. Побеленський КО, Гуріна ТМ, Легач ЄІ, Побеленська ЛА. Вплив контрольованого нагріву на результат кріодеструкції тканини щитовидної залози. *IX Міжнародна науково-практична конференція «Dynamics of the development of world science»*, Ванкувер, 13-15 травня, 2020; с. 838-842.
37. Божок ГА, Гурина ТМ, Побеленский КО, Пахомов АВ, Ревенко ЕБ, Легач ЕИ. Разработка методологического подхода к криодеструкции патологически измененной ткани щитовидной железы с использованием контролируемого охлаждения-нагрева. *Тези VI Міжнародного онкологічного форуму «Белые ночи»*, Санкт-Петербург, 25-28 червня 2020; с. 171.
38. Пашковська НВ. Лікування гіпотиреозу згідно із сучасними клінічними настановами. *Международный эндокринологический журнал*. 2016; № 6(78), 48-58. DOI: 10.22141/2224-0721.6.78.2016.81860
39. Тишковский СВ, Никонова ЛВ, Гулинская ОВ. Симптоматические артериальные гипертензии при эндокринной патологии. *Пособие для студентов лечебного, медико-психологического факультетов и врачей Гродно*. Издательство ГрГМУ. 2010; 104 с.
40. Черенько МС. Ендогенний субклінічний гіпертиреоз: сучасні погляди на діагностику і лікування (з огляду на останні настанови Європейської тиреоїдної асоціації). *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2016; № 3(55):95-99. DOI: [https://doi.org/10.24026/1818-1384.3\(55\).2016.77661](https://doi.org/10.24026/1818-1384.3(55).2016.77661)
41. Масловская АА. Биохимия гормонов. *Гродно: ГрГМУ*. 2012; 44.
42. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(Pt 1): 228-32. DOI: [10.1042/BST0330228](https://doi.org/10.1042/BST0330228).

43. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012; 122(9): 3035-3043. DOI:[10.1172/JCI60047](https://doi.org/10.1172/JCI60047)
44. Feige JN, Auwerx J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(6): 292–301. DOI:[10.1016/j.tcb.2007.04.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.04.001)
45. Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, Brent GA. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology.* 2010; 151(1): 432–440. DOI:[10.1210/en.2009-0667](https://doi.org/10.1210/en.2009-0667)
46. Webb P. Thyroid hormone receptor and lipid regulation. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010; 11(10): 1135–1142.
47. Sokolenko VL, Sokolenko SV. The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2017; 8(2): 231-238. DOI: [10.15421/021736](https://doi.org/10.15421/021736)
48. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH. The thyroid hormone receptorbeta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology.* 2000; 141(9): 3057–3064. DOI:[10.1210/endo.141.9.7681](https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7681)
49. Erion MD, Cable EE, Ito BR, Jiang H, Fujitaki JM, Finn PD, Zhang BH, Hou J, Boyer SH, van Poelje PD, Linemeyer DL. Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(39): 15490–15495. DOI:[10.1073/pnas.0702759104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702759104)
50. Duntas LH, Brenta G. The effect of thyroid disorders on lipid levels and metabolism. *Med Clin North Am.* 2012; 96: 269–81. DOI:[10.1016/j.mcna.2012.01.012](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.01.012)

51. Muller MJ, Burger AG, Ferrannini E, Jequier E, Acheson KJ. Glucoregulatory function of thyroid hormones: Role of pancreatic hormones. *Amer. J. Physiol.* 1989; 256: E101-E110. DOI:[10.1152/ajpendo.1989.256.1.E101](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.256.1.E101)
52. Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3(3): 249–259 DOI:[10.1038/ncpendmet0424](https://doi.org/10.1038/ncpendmet0424)
53. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010; 31(2): 139–170. DOI:[10.1210/er.2009-0007](https://doi.org/10.1210/er.2009-0007)
54. Roberts MR, Srinivas M, Forrest D, Morreale de Escobar G, Reh TA. Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(16): 6218–6223. DOI:[10.1073/pnas.0509981103](https://doi.org/10.1073/pnas.0509981103)
55. Gogakos AI, Duncan Bassett JH, Williams GR. Thyroid and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 503(1): 129–136. DOI:[10.1016/j.abb.2010.06.021](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.021)
56. Zimmermann MB. Iodine deficiency. *Endocr Rev.* 2009; 30(4): 376–408. DOI:[10.1210/er.2009-0011](https://doi.org/10.1210/er.2009-0011)
57. Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5:513–520. DOI: [10.1007/s11906-003-0060-7](https://doi.org/10.1007/s11906-003-0060-7)
58. Danzi S, Klein I. Thyroid disease and the cardiovascular system. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014; 43:517–28. DOI:[10.1016/j.ecl.2014.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ecl.2014.02.005)
59. Волкова НИ, Покршеян МИ. Эндокринные артериальные гипертензии. *Руководство для практических врачей, Москва: Ексмо, 2018, 144 с.*
60. Левина ЛИ. Сердце при эндокринных заболеваниях. *Ленинград. "Медицина": 1983; 245 с.*
61. Джанашия ПХ, Селиванова ГБ. Артериальная гипертензия при тиреотоксикозе: вопросы нейрогуморальной активации, гемодинамических и метаболических изменений. *Российский*

кардиологический журнал. 2004; (1): 73-79. Available from: <https://russjcardiol.elpub.ru/jour/article/view/1918/1588>

62. Palmieri EA, Fazio S, Palmieri V, Lombardi G, Biondi B. Myocardial contractility and total arterial stiffness in patients with overt hyperthyroidism: acute effects of B1-adrenergic blockade. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150: 757–62. DOI:[10.1530/eje.0.1500757](https://doi.org/10.1530/eje.0.1500757)
63. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, et al. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154: 197–212. DOI:[10.1530/eje.1.02093](https://doi.org/10.1530/eje.1.02093)
64. Santulli G, Cipolletta E, Sorriento D, Del Giudice C, Anastasio A, Monaco S, Maione AS, Condorelli G, Puca A, Trimarco B, Illario M, Iaccarino G. CaMK4 gene deletion induces hypertension. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1: e001081. DOI:[10.1161/JAHA.112.001081](https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001081)
65. Klein J, Ojama K. Thyroid hormone and cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(7): 501-9. DOI:[10.1056/NEJM200102153440707](https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440707)
66. Polikar R, Burger AG, Sherner U, Nicod P. The thyroid and the heart. *Circulation.* 1993; 87(5):1435-1441. DOI:[10.1161/01.cir.87.5.1435](https://doi.org/10.1161/01.cir.87.5.1435).
67. Marvisi M, Zambrelli P, Brianti M, Civardi G, Lampugnani R, Delsignore R. Pulmonary hypertension is frequent in hyperthyroidism and normalizes after therapy. *Eur J Intern Med.* 2006; 17:267–71. DOI:[10.1016/j.ejim.2005.11.023](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2005.11.023)
68. Sugiura T, Yamanaka S, Takeuchi H, Morimoto N, Kamioka M, Matsumura Y. Autoimmunity and pulmonary hypertension in patients with Graves' disease. *Heart Vessels.* 2015; 30: 642–6. DOI:[10.1007/s00380-014-0518-3](https://doi.org/10.1007/s00380-014-0518-3)
69. Lillevang-Johansen M, Abrahamsen B, Jørgensen HL, Brix TH, Hegedüs L. Duration of hyperthyroidism and lack of sufficient treatment are associated with increased cardiovascular risk. *Thyroid.* 2019; 10: 1–9. DOI:[10.1089/thy.2018.0320](https://doi.org/10.1089/thy.2018.0320)

70. Biondi B, Palmieri EA, Fazio S, Cosco C, Nocera M, Saccà L, Filetti S, Lombardi G, Perticone F. Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 4701–5. DOI: [10.1210/jc.85.12.4701](https://doi.org/10.1210/jc.85.12.4701);
71. Sawin CT, Geller A, Wolf PA, Belanger AJ, Baker E, Bacharach P, Wilson PW, Benjamin EJ, D'Agostino RB. Low serum thyrotropin concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older persons. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1249–52. DOI: [10.1056/nejm199411103311901](https://doi.org/10.1056/nejm199411103311901)
72. Manolis AA, Manolis TA, Melita H, Manolis AS. Subclinical thyroid dysfunction and cardiovascular consequences: an alarming wake-up call? *Trends Cardiovasc Med.* 2019;1:1–13. DOI: [10.1016/j.tcm.2019.02.011](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.02.011);
73. Popławska-Kita A, Siewko K, Telejko B, Modzelewska A, My'sliwiec J, Milewski R, et al. The changes in the endothelial function and haemostatic and inflammatory parameters in subclinical and overt hyperthyroidism. *Int J Endocrinol.* 2013; 981638. DOI: [10.1155/2013/981638](https://doi.org/10.1155/2013/981638)
74. Saito I, Ito K, Saruta T. Hypothyroidism as a cause of hypertension. *Hypertension.* 1983; 5:112–5. DOI: [10.1161/01.HYP.5.1.112](https://doi.org/10.1161/01.HYP.5.1.112)
75. Asvold BO, Bjørø T, Nilsen T IL, Vatten LJ. Association between blood pressure and serum thyroid-stimulating hormone concentration within the reference range: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:841–5. DOI: [10.1210/jc.2006-2208](https://doi.org/10.1210/jc.2006-2208)
76. Liu D, Jiang F, Shan Z, Wang B, Wang J, Lai Y, Chen Y, Li M, Liu H, Li C, Xue H, Li N, Yu J, Shi L, Bai X, Hou X, Zhu L, Lu L, Wang S, Xing Q, Teng W. A cross-sectional survey of relationship between serum TSH level and blood pressure. *J Hum Hypertens.* 2010; 24: 134–8. DOI: [10.1038/jhh.2009.44](https://doi.org/10.1038/jhh.2009.44)
77. Duan Y, Peng W, Wang X, Tang W, Liu X, Xu S, Mao X, Feng S, Feng Y, Qin Y, Xu K, Liu C, Liu C. Community based study of the association of

- subclinical thyroid dysfunction with blood pressure. *Endocrine*. 2009; 35: 136–42. DOI: [10.1007/s12020-008-9138-y](https://doi.org/10.1007/s12020-008-9138-y)
- 78.** Stott DJ, Rodondi N, Kearney PM, et al. Thyroid hormone therapy for older adults with subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med*. 2017; 376: 2534-2544. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1603825>
- 79.** O'Brien T, Dinneen SF, O'Brien PC, Palumbo PJ. Hyperlipidemia in patients with primary and secondary hypothyroidism. *Mayo Clin Proc*. 1993; 68:860–6. DOI: [10.1016/S0025-6196\(12\)60694-6](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)60694-6)
- 80.** Hak AE, Pols HAP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JCM. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med*. 2000; 132:270–8. DOI: [10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00030](https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00030)
- 81.** Obuobie K, Smith J, Evans LM, John R, Davies JS, Lazarus JH. Increased central arterial stiffness in hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 4662–6. DOI: [10.1210/jc.2002-020493](https://doi.org/10.1210/jc.2002-020493);
- 82.** Assem M, Saif A, Abdelhamid A, Tharwat N, Mousa S. Endothelial dysfunction and the risk of atherosclerosis in overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr Connect*. 2018; 7: 1075–80. DOI: [10.1530/ec-18-0194](https://doi.org/10.1530/ec-18-0194)
- 83.** Stabouli S, Papakatsika S, Kotsis V. Hypothyroidism and hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(11):1559-65. DOI: [10.1586/erc.10.141](https://doi.org/10.1586/erc.10.141).
- 84.** Williams Textbook of Endocrinology (Twelfth Edition) ed. by Drs. S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, and H. M. Kronenberg. Elsevier, 2012: 362-405.
- 85.** Ismailov S.I., Khayitboeva K.Kh. Problems of diagnostics and treatment of diffuse toxic goiter (Graves' disease). *Вестник СПбГУ. Медицина*. 2019; 14 (2): 98-104. DOI: doi.org/10.21638/spbu11.2019.202

- 86.Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European Thyroid Association guideline for the management of Graves' hyperthyroidism. *Eur Thyroid J*. 2018; 7(4): 167-186. DOI: [10.1159/000490384](https://doi.org/10.1159/000490384)
- 87.Emiliano AB, Governale L, Parks M, Cooper DS. Shifts in propylthiouracil and methimazole prescribing practices: antithyroid drug use in the United States from 1991 to 2008. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95 (5): 2227–2233. DOI: [10.1210/jc.2009-2752](https://doi.org/10.1210/jc.2009-2752)
- 88.Brito JP, Schilz S, Singh Ospina N, Rodriguez-Gutierrez R, Maraka S, Sangaralingham LR, Montori VM. Antithyroid drugs – the most common treatment for Graves' disease in the United States: a nationwide population-based study. *Thyroid*. 2016; 26(8): 1144–1145. DOI: [10.1089/thy.2016.0222](https://doi.org/10.1089/thy.2016.0222)
89. Azizi F, Amouzegar A. Management of hyperthyroidism during pregnancy and lactation. *Eur J Endocrinol*. 2011 Jun;164(6):871-6. DOI: [10.1530/EJE-10-1030](https://doi.org/10.1530/EJE-10-1030).
- 90.Briggs G, Freeman R, Yaffe S. Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk. Ninth edition, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: 2011, 1728 p.
- 91.Sundaresh V, Brito JP, Wang Z, Prokop LJ, Stan MN, Murad MH, Bahn RS. Comparative effectiveness of therapies for Graves' hyperthyroidism: a systematic review and network meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(9): 3671–3677. DOI: [10.1210/jc.2013-1954](https://doi.org/10.1210/jc.2013-1954)
- 92.Bonnema SJ, Hegedus L: Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome. *Endocr Rev*. 2012; 33(6): 920–980. DOI: [10.1210/er.2012-1030](https://doi.org/10.1210/er.2012-1030)
- 93.Nygaard B, Hegedus L, Gervil M, Hjalgrim H, Hansen BM, Soe-Jensen P, Hansen JM: Influence of compensated radioiodine therapy on thyroid volume and incidence of hypothyroidism in Graves' disease. *J Intern Med* 1995; 238(6): 491–497. DOI: [10.1111/j.1365-2796.1995.tb01230.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1995.tb01230.x).

- 94.Xing YZ, Zhang K, Jin G. Predictive factors for the outcomes of Graves' disease patients with radioactive iodine (¹³¹I) treatment. *Biosci Rep.* 2020; 40(1): BSR20191609. DOI: [10.1042/BSR20191609](https://doi.org/10.1042/BSR20191609)
- 95.Sung T.Y., Lee YM, Yoon JH, Chung KW, Hong SJ. Long-Term Effect of Surgery in Graves' Disease: 20 Years Experience in a Single Institution. *Int J Endocrinol.* 2015; 2015: 542641. DOI: [10.1155/2015/542641](https://doi.org/10.1155/2015/542641)
- 96.Ismailov S.I., Alimdjanov N.A., Babakhanov B.Kh., Rashitov M.M., Akbutaev A.M. Long-term results after total thyroidectomy in patients with Graves' disease in Uzbekistan: retrospective study. *World Journal Of Endocrine Surgery*, 2011; 3(2): 79–82. DOI: [10.5005/jp-journals-10002-1062](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10002-1062)
- 97.Woods R. Total thyroidectomy versus bilateral subtotal thyroidectomy in patients with Graves' diseases: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2014; 80(2): 316. DOI: [10.1111/cen.12231](https://doi.org/10.1111/cen.12231)
- 98.Bojic T, Paunovic I, Diklic A, Zivaljevic V, Zoric G, Kalezic N, Sabljak V, Slijepcevic N, Tausanovic K, Djordjevic N, Budjevac D, Djordjevic L, Karanikolic A. Total thyroidectomy as a method of choice in the treatment of Graves' disease - analysis of 1432 patients. *BMC Surg.* 2015;15:39. DOI: [10.1186/s12893-015-0023-3](https://doi.org/10.1186/s12893-015-0023-3).
- 99.Stathopoulos P., Gangidi S, Kotrotsos G, Cunliffe D. Graves' disease: A review of surgical indications, management, and complications in a cohort of 59 patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015; 44(6): 713–717. <http://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.02.007>
100. Genovese BM, Noureldine SI, Gleeson EM, Tufano RP, Kandil E: What is the best definitive treatment for Graves' disease? A systematic review of the existing literature. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20: 660–667. DOI: [10.1245/s10434-012-2606-x](https://doi.org/10.1245/s10434-012-2606-x).
101. Guo Z, Yu P, Liu Z, Si Y, Jin M: Total thyroidectomy vs bilateral subtotal thyroidectomy in patients with Graves' diseases: a meta-analysis of

- randomized clinical trials. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; 79(5): 739-46. DOI: [10.1111/cen.12209](https://doi.org/10.1111/cen.12209)
102. Christou N., Mathonnet M. Complications after total thyroidectomy. *J. Visc. Surg.* 2013; 150: 249–256. <http://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2013.04.003>
 103. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue culture cells. *Exp Cell Res.* 1972; 71: 345-55. DOI: [10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)
 104. Жегунов ГФ, Нардид ОА. Основы криобиологии и криомедицины. Учебник для студентов-биологов и медиков. Харьков : Бровин А. В. : 2019; 614 с.
 105. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Монография. Под редакцией Калугина Ю.В. и Никитина И.И. Киев: Наукова думка, 1994: 432 с.
 106. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009; 5(3): 90-96. DOI: [10.4161/org.5.3.10021](https://doi.org/10.4161/org.5.3.10021).
 107. Bank H. Visualization of freezing damage. II. Structural alterations during warming. *Cryobiology*. 1973; 10(2): 157-70. DOI: [10.1016/0011-2240\(73\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(73)90023-0).
 108. Bank H, Mazur P. Visualization of freezing damage. *J Cell Biol.* 1973; 57(3): 729-742. DOI: [10.1083/jcb.57.3.729](https://doi.org/10.1083/jcb.57.3.729).
 109. Len JS, Koh WSD, Tan SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci Rep.* 2019;39(8). DOI: [10.1042/BSR20191601](https://doi.org/10.1042/BSR20191601).
 110. Baust JG, Gage AA. The molecular basis of cryosurgery. *BJU Int.* 2005; 95(9): 1187-91. DOI: [10.1111/j.1464-410X.2005.05502.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05502.x);
 111. Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*. 2002; 60: 40–9. DOI: [10.1016/s0090-4295\(02\)01683-7](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01683-7).

112. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73: 2013–2026. DOI: [10.1002/1097-0142\(19940415\)73:8<2013::aid-cnrcr2820730802>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::aid-cnrcr2820730802>3.0.co;2-j).
113. Yiu WK, Basco MT, Aruny JE, Cheng SW, Sumpio BE. Cryosurgery: A review. *Int J Angiol*. 2007; 16(1): 1-6. DOI: [10.1055/s-0031-1278235](https://doi.org/10.1055/s-0031-1278235)
114. Bischof JC, Cristof K, Rubinsky B. A morphological study of the cooling rate response of normal and neoplastic human liver tissue: Cryosurgical implications. *Cryobiology*. 1993; 30: 482–92. DOI: [10.1006/cryo.1993.1049](https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1049).
115. Bischof JC, Smith D, Pazhayannur PV, Manivel C, Hulbert J, Roberts KP. Cryosurgery of Dunning AT-1 rat prostate tumor: thermal, biophysical, and viability response at the cellular and tissue level. *Cryobiology*. 1997; 34: 42–69. DOI: [10.1006/cryo.1996.1978](https://doi.org/10.1006/cryo.1996.1978).
116. Hong J, Rubinsky B. Patterns of ice formation in normal and malignant breast tissue. *Cryobiology*. 1994; 31: 109–20. DOI: [10.1006/cryo.1994.1015](https://doi.org/10.1006/cryo.1994.1015).
117. Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology*. 2014; 68(1): 1-11. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.11.001).
118. Чиж НА. Эндоскопическая криохирurgia. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2017; 27(1): 3-18. DOI: doi.org/10.15407/cryo27.01.003
119. Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology*. 2009; 58 (1): 1-11. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2008.10.126](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.10.126).
120. Gage AA, Baust JG. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998; 37(3): 171–86. DOI: [10.1006/cryo.1998.2115](https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2115).

121. Baissalov R, Sandison GA, Reynolds D, Muldrew K. Simultaneous optimization of cryoprobe placement and thermal protocol for cryosurgery. *Phys Med Biol*. 2001; 46(7): 1799-814. DOI: 10.1088/0031-9155/46/7/305
122. Young JL, McCormick DW, Kolla SB, Sountoulides PG, Kaufmann OG, Ortiz-Vanderdys CG, Huynh VB, Kaplan AG, Jain NS, Pick DL, Andrade LA, Osann KE, McDougall EM, Clayman RV. Are multiple cryoprobes additive or synergistic in renal cryotherapy? *Urology*. 2012; 79(2): 484.e1-484.e4846. DOI: 10.1016/j.urology.2011.10.042
123. Демичев НП, Горбатенко АИ. Криохирurgia опухолей костей нижних конечностей. Изд. Астрахань: 2005; 246 с.
124. Bickels J, Rubert CK, Meller I, Malawer MM. Cryosurgery in the treatment of bone tumors. *Operat. Techniq. in Orthop*. 1999; 9(2): 79-83.
125. Borodai YP, Verkin BI, Zhitomirskii IS, Itskov EYa. Classification of instruments for cryosurgery. *Biomed Eng*. 1971; 5: 224–226. <https://doi.org/10.1007/BF00561077>
126. Zacarian S. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis. In: Zacarian S.A., ed. *Cryosurgery for Skin Cancer and Cutaneous Disorders*. St Louis: Mosby, 1985: 1-30.
127. Грищенко ВИ. Методы локального низкотемпературного воздействия в криомедицине. *Проблемы криобиологии*. 2001; 2: 92-100.
128. Yılmaz S, Özdoğan M, Cevener M, Ozluk A, Kargi A, Kendiroglu F, Ogretmen I, Yildiz A. Use of cryoablation beyond the prostate. *Insights Imaging*. 2016;7(2):223-232. DOI:10.1007/s13244-015-0460-7
129. Кубышкин ВА, Ионкин ДА, Кунгурцев СВ, Чжао АВ. История криохирургии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2015;(5): 62-74.
130. Le Pivert P, Haddad RS, Aller A, Titus K, Doulat J, Renard M, Morrison DR. Ultrasound guided combined cryoablation and microencapsulated 5-Fluorouracil inhibits growth of human prostate tumors in xenogenic mouse model assessed by luminescence imaging. *Technol Cancer Res Treat*. 2004; 3(2): 135-42. DOI:10.1177/153303460400300206.

131. Inoue M, Nakatsuka S, Yashiro H, et al. Percutaneous cryoablation of lung tumors: feasibility and safety. *J Vasc Interv Radiol*.2012; 23: 295–302. DOI: [10.1016/j.jvir.2011.11.019](https://doi.org/10.1016/j.jvir.2011.11.019).
132. Hinshaw JL, Littrup PJ, Durick N, Leung W, Lee FT, Jr, Sampson L, et al. Optimizing the protocol for pulmonary cryoablation: a comparison of a dual- and triple-freeze protocol. *Cardiovasc Intervent Radiol*.2010; 33(6): 1180–1185. DOI:[10.1007/s00270-010-9868-0](https://doi.org/10.1007/s00270-010-9868-0).
133. Lee KS, Erinjeri JP. Decision making in interventional oncology: ablative options in the lung. *Semin Intervent Radiol*.l 2017; 34(2): 176–181. DOI:[10.1055/s-0037-1602592](https://doi.org/10.1055/s-0037-1602592).
134. McCarthy T, Kuhn J A. Cryotherapy for liver tumors. *Oncology*. 1998; 12(7): 979–993.
135. Niu LZ, Li JL, Xu KC. Percutaneous Cryoablation for Liver Cancer. *J Clin Transl Hepatol*. 2014; 2(3): 182-188. DOI:[10.14218/JCTH.2014.00017](https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00017)
136. Xu KC, Niu LZ, He WB, Guo ZQ, Hu YZ, Zuo JS. Percutaneous cryoablation in combination with ethanol injection for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(12): 2686-9. DOI: [10.3748/wjg.v9.i12.2686](https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i12.2686).
137. Zhou L, Yang YP, Feng YY. Efficacy of argon-helium cryosurgical ablation on primary hepatocellular carcinoma: a pilot clinical study. *Ai Zheng*. 2009; 28(1): 45–48.
138. Niu L, He L, Zhou L, Mu F, Wu B, Li H, Yang Z, Zuo J, Xu K. Percutaneous ultrasonography and computed tomography guided pancreatic cryoablation: feasibility and safety assessment. *Cryobiology*. 2012;65(3):301–307. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.08.004).
139. Niu L, Wang Y, Yao F, Wei C, Chen Y, Zhang L, Chen J, Li J, Zuo J, Xu K. Alleviating visceral cancer pain in patients with pancreatic cancer using cryoablation and celiac plexus block. *Cryobiology*. 2013;66(2):105–111. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2012.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.12.002).

140. Xu KC, Niu LZ, Hu YZ, He WB, He YS, Li YF, Zuo JS. A pilot study on combination of cryosurgery and (125)iodine seed implantation for treatment of locally advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(10): 1603–1611. DOI: [10.3748/wjg.14.1603](https://doi.org/10.3748/wjg.14.1603).
141. Xu KC. Pancreatic cancer. In: Xu KC, Niu LZ, editors. *Cryosurgery For Cancer*. Shanghai: Shanghai Science-Technology-Education Pub: 2007: 234–245.
142. Ghorbani S, Tsai FC, Greenwald BD. Safety and efficacy of endoscopic spray cryotherapy for Barrett's dysplasia: results of the National Cryospray Registry. *Dis Esophagus*. 2016;29(3):241–247. DOI: [10.1111/dote.12330](https://doi.org/10.1111/dote.12330).
143. Greenwald BD, Dumot JA, Abrams JA. Endoscopic spray cryotherapy for esophageal cancer: safety and efficacy. *Gastrointest Endosc*. 2010; 71(4): 686–693. DOI: [10.1016/j.gie.2010.01.042](https://doi.org/10.1016/j.gie.2010.01.042).
144. Dumot JA, Greenwald BD. Argon plasma coagulation, bipolar cautery, and cryotherapy: ABC's of ablative techniques. *Endoscopy*. 2008; 40(12): 1026-1032. DOI: [10.1055/s-0028-1103414](https://doi.org/10.1055/s-0028-1103414).
145. ASGE Technology Committee, Parsi MA, Trindade AJ, Bhutani MS, Melson J, Navaneethan U, Thosani N, Trikudanathan G, Watson RR, Maple JT. Cryotherapy in gastrointestinal endoscopy. *VideoGIE*. 2017; 2(5): 89-95. DOI: [10.1016/j.vgie.2017.01.021](https://doi.org/10.1016/j.vgie.2017.01.021)
146. Henry CA, Bailey L, Harness JK, Simmons R. Office-based cryoablation of breast fibroadenomas: 12-month followup. *J Am Coll Surg*. 2004;198(6):914–923. DOI: [10.1016/j.jamcollsurg.2004.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.02.014)
147. Roubidoux MA, Yang W, Stafford RJ. Image-guided ablation in breast cancer treatment. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2014;17(1):49–54. DOI: [10.1053/j.tvir.2013.12.008](https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.008).
148. Manenti G, Perretta T, Gaspari E, et al. Percutaneous local ablation of unifocal subclinical breast cancer: clinical experience and preliminary

- results of cryotherapy. *Eur Radiol.* 2011; 21(11): 2344–2353. DOI: [10.1007/s00330-011-2179-2](https://doi.org/10.1007/s00330-011-2179-2).
- 149.** Pfleiderer SO, Freesmeyer MG, Marx C, Kühne-Heid R, Schneider A, Kaiser WA. Cryotherapy of breast cancer under ultrasound guidance: initial results and limitations. *Eur Radiol.* 2002; 12(12): 3009–3014. DOI: [10.1007/s00330-002-1511-2](https://doi.org/10.1007/s00330-002-1511-2).
- 150.** Lanza E, Palussiere J, Buy X. Percutaneous image-guided cryoablation of breast cancer: a systematic review. *J Vasc Interv Radiol.* 2015; 26(11): 1652–1657. DOI: [10.1016/j.jvir.2015.07.020](https://doi.org/10.1016/j.jvir.2015.07.020).
- 151.** Simmons RM, Ballman KV, Cox C, et al. A phase II trial exploring the success of cryoablation therapy in the treatment of invasive breast carcinoma: results from ACOSOG (Alliance) Z1072. *Ann Surg Oncol.* 2016; 23(8): 2438–2445. DOI: [10.1245/s10434-016-5275-3](https://doi.org/10.1245/s10434-016-5275-3).
- 152.** Pusceddu C, Melis L, Ballicu N, et al. Cryoablation of primary breast cancer in patients with metastatic disease: considerations arising from a single-centre data analysis. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 3839012. DOI: [10.1155/2017/3839012](https://doi.org/10.1155/2017/3839012).
- 153.** Filippiadis DK, Tutton S, Mazioti A, Kelekis A. Percutaneous image-guided ablation of bone and soft tissue tumours: a review of available techniques and protective measures. *Insights Imaging.* 2014 ; 5(3): 339-46. DOI: [10.1007/s13244-014-0332-6](https://doi.org/10.1007/s13244-014-0332-6)
- 154.** Андрианов ВЛ, Писаревский АА, Кулиев АМ, Войтына СВ. Гемостатический эффект глубокого замораживания при оперативном лечении доброкачественных опухолей костей и пограничных заболеваний. *Сборник трудов ЦИТО. М.: 1975:* 124–127.
- 155.** Havez M, Lippa N, Al-Ammari S, Kind M, Stoeckle E, Italiano A, Gangi A, Hauger O, Cornelis F. Percutaneous image-guided cryoablation in inoperable extra-abdominal desmoid tumors: a study of tolerability and efficacy. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2014; 37(6):1500-6. DOI: [10.1007/s00270-013-0830-9](https://doi.org/10.1007/s00270-013-0830-9).

156. Callstrom MR, Kurup AN. Percutaneous ablation for bone and soft tissue metastases-why cryoablation? *Skeletal Radiol.* 2009; 38(9):835-9. DOI: [10.1007/s00256-009-0736-4](https://doi.org/10.1007/s00256-009-0736-4).
157. Filippiadis DK, Kelekis A Br. A review of percutaneous techniques for low back pain and neuralgia: current trends in epidural infiltrations, intervertebral disk and facet joint therapies. *J Radiol.* 2016; 89(1057):20150357. DOI: [10.1259/bjr.20150357](https://doi.org/10.1259/bjr.20150357)
158. Zargar H, Atwell TD, Cadeddu JA, et al. Cryoablation for small renal masses: selection criteria, complications, and functional and oncologic results. *Eur Urol.* 2016; 69(1): 116-28. DOI: [10.1016/j.eururo.2015.03.027](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.03.027)
159. Kurup AN. Percutaneous ablation for small renal masses-complications. *Semin Interv Radiol.* 2014; 31(1): 42–49. DOI: [10.1055/s-0033-1363842](https://doi.org/10.1055/s-0033-1363842).
160. Rodríguez SA, Arias Fúnez F, Bueno Bravo C, et al. Cryotherapy for primary treatment of prostate cancer: intermediate term results of a prospective study from a single institution. *Prostate Cancer.* 2014; 2014: 571576. DOI: [10.1155/2014/571576](https://doi.org/10.1155/2014/571576).
161. Сипитый ВИ, Цыганков АВ. Трансназально-трансфеноидальная криохирургия аденом гипофиза. *Укр. нейрохірург. журнал.* 2007; 4: 8–11.
162. Цыганков ОВ. Порівняльний аналіз ефективності методу кріохірургії аденом гіпофіза. *Експерим. і клін. медицина.* 2012; 55(2): 164–168. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/eikm_2012_2_32
163. Welch BT, Atwell TD, Nichols DA, Wass CT, Callstrom MR, Leibovich BC, Carpenter PC, Mandrekar JN, Charboneau JW. Percutaneous image-guided adrenal cryoablation: procedural considerations and technical success. *Radiology.* 2011; 258(1): 301-7. DOI: [10.1148/radiol.10100631](https://doi.org/10.1148/radiol.10100631)
164. Valcavi R, Frasoldati A. Ultrasound-guided percutaneous ethanol injection therapy in thyroid cystic nodules. *Endocr Pract.* 2004; 10 (3): 269-75. DOI: [10.4158/EP.10.3.269](https://doi.org/10.4158/EP.10.3.269).

165. Garberoglio R, Aliberti C, Appetecchia M, et al. Radiofrequency ablation for thyroid nodules: which indications? The first Italian opinion statement. *J Ultrasound*. 2015;18 (4): 423-30. DOI: [10.1007/s40477-015-0169-y](https://doi.org/10.1007/s40477-015-0169-y).
166. Morelli F, Sacrini A, Pompili G, et al. Microwave ablation for thyroid nodules: a new string to the bow for percutaneous treatments? *Gland Surg*. 2016; 5(6): 553-8. DOI: [10.21037/gs.2016.12.07](https://doi.org/10.21037/gs.2016.12.07).
167. Valcavi R, Riganti F, Bertani A, et al. Percutaneous laser ablation of cold benign thyroid nodules: a 3-year follow-up study in 122 patients. *Thyroid*. 2010; 20 (11): 1253-61. DOI: [10.1089/thy.2010.0189](https://doi.org/10.1089/thy.2010.0189).
168. Хазієв ВВ, Тяжелова ОВ, Македонська ВО. Сонографічні зміни структури та об'єму щитоподібної залози після локального інтраопераційного кріовпливу у хворих на вузловий еутиреоїдний зоб. *Проблеми криобіології та криомедицини*. 2013; 23 (3): 240-6. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/300>
169. Hamed MS, Mansour S Z, Halawa M R, Bahaaeldin A M, Ibrahim N A, Ghoneim A Z, Cryoablation of goiter irrespective of thyroid profile, *QJM: An International Journal of Medicine*. 2020; 113, (Supplement_1): hcaa052.050/ <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcaa052.050>
170. Hamed MS, Mansour SZ, Halawa MR. Cryoablation of goiter irrespective of thyroid profile. *Thyroid Res Pract*. 2019; 16 (1): 6-11. DOI: [10.4103/trp.trp_54_18](https://doi.org/10.4103/trp.trp_54_18)
171. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 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. *Thyroid*. 2016; 26(1): 1-133. DOI: [10.1089/thy.2015.0020](https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020)
172. Polychronakos C, Guyda HJ, Patel B, Posner BI. Increase in the number of type II insulin-like growth factor receptors during

- propylthiouracil-induced hyperplasia in the rat thyroid. *Endocrinology*. 1986; 119 (3): 1204-1209. <https://doi.org/10.1210/endo-119-3-1204>
173. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. М.: СпецЛит, **2015: 807** с.
 174. Шацева ТА, Мухина МС. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции. *Вопросы онкологии*. 2004; 50 (2): 157-164.
 175. Легач Е.И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза. *Трансплантология*. 2005; 8(2): 92-94.
 176. Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, Abderrahim F, Briones AM, Condezo-Hoyos L, Regadera J, Susin C, Gomez de Diego JJ, Delgado-Baeza E, Diaz-Gil JJ, Arribas SM. Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(3): H1153-65. DOI: [10.1152/ajpheart.00886.2010](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00886.2010).
 177. Kolwicz SC, MacDonnell SM, Renna BF, et al. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(4): H1361-H1368. DOI: [10.1152/ajpheart.01253.2008](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01253.2008)
 178. Laezza C, Mazziotti G, Fiorentino L, Gazzerо P, Portella G, Gerbasio D, Carella C, Matarese G, Bifulco M. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit rat propylthiouracil-induced goiter by modulating the ras-MAPK pathway. *J Mol Med (Berl)*. 2006; 84(11): 967-973. DOI: [10.1007/s00109-006-0079-8](https://doi.org/10.1007/s00109-006-0079-8)
 179. Abdolhosseinipoor F., Sadeghi-Dinani M., Hosseini-Sharifabad A. The effects of *Urtica dioica* hydroalcoholic extract on the propylthiouracil induced hypothyroidism in rat. *J Herbmed Pharmacol*. 2018; 7(4): 300-305. DOI: [10.15171/jhp.2018.45](https://doi.org/10.15171/jhp.2018.45)
 180. Nambiar PR, Palanisamy GS, Okerberg C, Wolford A, Walters K, Buckbinder L, Reagan WJ. Toxicities associated with 1-month treatment

- with propylthiouracil (PTU) and methimazole (MMI) in male rats. *Toxicol Pathol.* 2014; 42(6): 970-983. DOI: [10.1177/0192623313502708](https://doi.org/10.1177/0192623313502708)
181. Shih SR, Jan IS, Chen KY, Chuang WY, Wang CY, Hsiao YL, Chang TC, Chen A. Computerized cytological features for papillary thyroid cancer diagnosis-preliminary report. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(11): 1645. DOI: [10.3390/cancers11111645](https://doi.org/10.3390/cancers11111645).
 182. Fozzatti L, Alaminio VA, Park S, Giusiano L, Volpini X, Zhao L, Stempin CC, Donadio AC, Cheng SY, Pellizas CG. Interplay of fibroblasts with anaplastic tumor cells promotes follicular thyroid cancer progression. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 8028. DOI: [10.1038/s41598-019-44361-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44361-6)
 183. Mellert W, Deckardt K, Walter J, Gfatter S, van Ravenzwaay B. Detection of endocrine-modulating effects of the antithyroid acting drug 6-propyl-2-thiouracil in rats, based on the "Enhanced OECD Test Guideline 407". *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003; 38(3): 368-77. DOI: [10.1016/j.yrtph.2003.07.003](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.07.003).
 184. Malozowski S, Chiesa A. Propylthiouracil-induced hepatotoxicity and death. Hopefully, never more. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(7): 3161-3163. DOI: [10.1210/jc.2010-1141](https://doi.org/10.1210/jc.2010-1141)
 185. Gomez-Peralta F, Velasco-Martínez P, Abreu C, Cepeda M, Fernández-Puente M. Hepatotoxicity in hyperthyroid patient after consecutive methimazole and propylthiouracil therapies. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2018; 2018: 17-0173. DOI: [10.1530/EDM-17-0173](https://doi.org/10.1530/EDM-17-0173)
 186. Heidari R, Niknahad H, Jamshidzadeh A, Eghbal MA, Abdoli N. An overview on the proposed mechanisms of antithyroid drugs-induced liver injury. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(1): 1-11. DOI: [10.5681/apb.2015.001](https://doi.org/10.5681/apb.2015.001).
 187. Hoy W.E., Douglas-Denton R.N., Hughson M.D. A stereological study of glomerular number and volume: preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney Int Suppl.* 2003; 83: S31–S37. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s83.8.x>

188. Denic A., Glassock R.J., Rule A.D. Structural and functional changes with the aging kidney. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016; 23: 19–28. DOI: [10.1053/j.ackd.2015.08.004](https://doi.org/10.1053/j.ackd.2015.08.004)
189. Iliev AA, Kotov GN, Dimitrova IN, Landzhov BV. Evaluation of structural myocardial changes during chronic hypertensive states in rats. *J Cardiol and Cardiovasc Sciences.* 2018; 2(1): 1-9. Available from: <https://www.cardiologyresearchjournal.com/articles/evaluation-of-structural-myocardial-changes-during-chronic-hypertensive-states-in-rats.html>
190. Tegler L, Gillquist J, Anderberg B, Lundström B, Johansson H. Thyroid blood flow rate in man. Electromagnetic flowmetry during operation in euthyroid normal gland, nontoxic goiter, and hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest.* 1981; 4 (3): 335–41. DOI: [10.1007/BF03349454](https://doi.org/10.1007/BF03349454)
191. Vita R, Di Bari F, Perelli S, Capodicasa G, Benvenga S. Thyroid vascularization is an important ultrasonographic parameter in untreated Graves' disease patients. *J Clin Transl Endocrinol.* 2019; 15: 65–69. DOI: [10.1016/j.jcte.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jcte.2019.01.001).
192. Бутова ОА, Боташева ВС, Головки ЕМ. Патогистологическая характеристика щитовидной железы при эндемическом зобе. *Вестник Ставропольского государственного университета.* 2010; (69):182–6. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/patogistologicheskaya-harakteristika-schitovidnoy-zhelezy-pri-endemicheskom-zobe/viewer>
193. Rognoni JB, Penel C, Bastiani P, et al. Involution of hyperplastic goitre in the adult male rat. Tissue compartment process with early iodide effect: a stereological and biochemical study. *Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1987; 53 (3): 166–175. DOI: [10.1007/BF02890240](https://doi.org/10.1007/BF02890240)
194. Pomorski L, Bartos M, Matejkowska M, et al. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model. *Cryobiology.* 1999; 39 (3): 262–70. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2209>

195. Pomorski L, Bartos M, Amsolik M, Cieplucha J, Jóźwik K, Narebski J, Pisarek H, Kołodziejczyk M, Kuzdak K. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model-topography of temperature during therapy and functional results. *Cryobiology*. 2000 ;41 (1): 51-7. DOI: 10.1006/cryo.2000.2264
196. Zhang YT, Liu J, Zhou YX. Pilot study on cryogenic heat transfer in biological tissues embedded with large blood vessels. *Forschung Im Ingenieurwesen*. 2002; 67(5): 188-197. DOI: 10.1007/s10010-002-0090-3
197. Breckenridge RA. Animal models of myocardial disease. In: Animal models for the study of human disease. Ed. By Edited by Conn PM. *Academic Press*, 2013: 145-171.
198. Boluyt MO, Bing OHL, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *European Heart Journal*. 1995; 16 suppl: 19-30. DOI: 10.1093/eurheartj/16.suppl_n.19.
199. Limas C, Westrum B, Limas CJ. The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Pathol*. 1980; 98(2): 357-384. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1903410/>
200. Limas C, Westrum B, Limas CJ. Effect of antihypertensive therapy on the vascular changes of spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol*. 1983; 111(3): 380-393. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1916276/>
201. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev*. 1992; 72(3): 667-97. DOI: 10.1152/physrev.1992.72.3.667
202. Федоров С.В., Нигматуллин Р.Т., Нартайлаков М.А., Кашаев М.Ш. Стимуляция регенерации остаточной ткани щитовидной железы в эксперименте. *Вестник Башкирского университета*. 2006; 1: 72-75.

Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/stimulyatsiya-regeneratsii-ostatochnoy-tkani-schitovidnoy-zhelezy-v-eksperimente/viewer>

203. Clark OH, Lambert WR, Cavalieri RR, Rapoport B, Hammond ME, Ingbar SH. Compensatory thyroid hypertrophy after hemithyroidectomy in rats. *Endocrinology*. 1976; 99(4): 988-95. DOI: [10.1210/endo-99-4-988](https://doi.org/10.1210/endo-99-4-988)
204. The thyroid gland. Fundamental aspects. Ed. prof. A.I. Kubarko and prof. S. Yamashita. Minsk – Nagasaki: 1998: 368 c.
205. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018; 127(2): 175-186. DOI: [10.1007/s00412-018-0659-8](https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8).
206. Ye P, Kong Y, Chen X, Li W, Liu D, Xie Y, Zhou Y, Zou H, Chang Z, Dai H, Kong X, Liu P. Fe₃O₄ nanoparticles and cryoablation enhance ice crystal formation to improve the efficiency of killing breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017; 8(7): 11389-11399. DOI: [10.18632/oncotarget.13859](https://doi.org/10.18632/oncotarget.13859)
207. Liu X, Zhao G, Shu Z, Niu D, Zhang Z, Zhou P, Cao Y, Gao D. Quantification of intracellular ice formation and recrystallization during freeze-thaw cycles and their relationship with the viability of pig iliac endothelium cells. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(6): 511-519. DOI: [10.1089/bio.2015.0111](https://doi.org/10.1089/bio.2015.0111)
208. Гурина ТМ, Кирилюк АЛ. Определение температурных интервалов фазовых преобразований в компонентах криозащитных сред методом термопластической деформации. *Проблемы криобиологии*. 2012; 22(4): 410-422. Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2012_22_4_5
209. Gurina TM, Pakhomov AV, Kyryliuk AL, Bozhok GA. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below -60°C. *Cryobiology*. 2011; .62(2): 107-114. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2011.01.011](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.01.011)
210. Karlsson JOM. A theoretical model of intracellular devitrification. *Cryobiology*. 2001; 42(3): 154-69. DOI: [10.1006/cryo.2001.2318](https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2318)

211. Routledge C, Armitage WJ Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing. *Cryobiology*. 2003; 46(3): 277-83. DOI: [10.1016/s0011-2240\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00044-0)
212. Gage AA, Guest K, Montes M, Caruana JA, Whalen DA Jr. Effect of varying freezing and thawing rates in experimental cryosurgery. *Cryobiology*. 1985; 22(2): 175-82. DOI: [10.1016/0011-2240\(85\)90172-5](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90172-5)
213. Biondi, B., Klein, I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocr* **24**, 1–13 (2004). <https://doi.org/10.1385/ENDO:24:1:001>
214. Kristensen S.D., Knuuti J., Saraste A. et al. Authors/Task Force Members. 2014ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur. Heart. J.* 2014; 14(35), Suppl. 35: 2383–2431. DOI: [10.1093/eurheartj/ehu282](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu282)
215. Заболотских ИБ, Баутин АЕ, Григорьев ЕВ, Грицан АИ, Лебединский КМ, Потиевская ВИ, Руднов ВА, Субботин ВВ, Хороненко ВЭ, Шадрин РВ. Периоперационное ведение пациентов с артериальной гипертензией. Методические рекомендации. *Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова*. 2020; 2: 7-33. DOI: [10.21320/1818-474X-2020-2-7-33](https://doi.org/10.21320/1818-474X-2020-2-7-33)
216. Hood A, Liu YP, Gattone VH 2nd, Klaassen CD. Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicol Sci.* 1999; 49(2): 263-271. DOI: [10.1093/toxsci/49.2.263](https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.263)
217. Elkalawy SA, Abo-Elmour RK, El Deeb DF, Yousry MM. Histological and immunohistochemical study of the effect of experimentally induced hypothyroidism on the thyroid gland and bone of male albino rats.

- Egyptian Journal of Histology*. 2013; 36 (1): 92-102. DOI: [10.1097/01.EHX.0000424169.63765.ac](https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000424169.63765.ac)
218. Ferreira E, Silva AE, Serakides R, Gomes AES, Cassali GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007; 59 (5): 1245–1249. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000500022>
 219. Mostaghni K, Badieli K, Khodakaram-Tafti A, et al. Pathological and biochemical studies of experimental hypothyroidism in sheep. *Veterinarski arhiv*. 2008; 78 (3): 209-216. Available from: https://www.researchgate.net/publication/237304447_Pathological_and_biochemical_studies_of_experimental_hypothyroidism_in_sheep
 220. Griswold WR, Mendoza SA, Johnston W. Vasculitis associated with propylthiouracil. Evidence for immune complex pathogenesis and response to therapy. *West J Med*. 1978; 128 (6): 543-546. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1238208/>
 221. Polio J, Groszmann RJ, Reuben A, Sterzel RB, Better OS. Portal hypertension ameliorates arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hepatol*. 1989; 8(3): 294-301. DOI: [10.1016/0168-8278\(89\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0168-8278(89)90026-3).
 222. Kaufman S., Jody Levasseur J. Effect of portal hypertension on splenic blood flow, intrasplenic extravasation and systemic blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(6): R1580-1585. DOI: [10.1152/ajpregu.00516.2002](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00516.2002)
 223. Freitas CRL, Barbosa AA, Fernandes ALM, Andraden ZA. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(6): 815-822. DOI: [10.1590/s0074-02761999000600019](https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000600019)
 224. Iliev AA, Kotov GN, Landzhov BV, Jelev LS, Kirkov VK, Hinova-Palova DV. A comparative morphometric study of the myocardium during the postnatal development in normotensive and spontaneously hypertensive

- rats. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018; 77(2): 253-265. DOI: [10.5603/FM.a2017.0094](https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0094)
225. Wagner C, Ebner B, Tillack D, Strasser RH, Weinbrenner C. Cardioprotection by ischemic postconditioning is abrogated in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013; 61(1): 35-41, DOI: [10.1097/FJC.0b013e3182760c4d](https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182760c4d)
226. Okabe M, Kawamura K, Terasaki F, Hayashi T. Remodeling of cardiomyocytes and their branches in juvenile, adult, and senescent spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats: comparative morphometric analyses by scanning electron microscopy. *Heart Vessels*. 1999; 14(1): 15-28. DOI: [10.1007/BF02481739](https://doi.org/10.1007/BF02481739)
227. Viazzi F, Leoncini G, Ratto E, Parodi A, Falqui V, Conti N, Tomolillo C, Ravera G, Deferrari G, Pontremoli R. Vascular permeability, blood pressure, and organ damage in primary hypertension. *Hypertens Res*. 2008; 31(5): 873-9. DOI: [10.1291/hypres.31.873](https://doi.org/10.1291/hypres.31.873)
228. Македонская В.А., Хазиев ВВ, Тяжелова ОВ. Влияние дозированного криовоздействия на репаративный процесс в щитовидной железе после хирургического лечения диффузного токсического зоба (по данным ультразвукового исследования). *Проблемы криобиологии*. 2006; 16(1): 88-93. Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2006_16_1_13
229. Toda S, Aoki S, Suzuki K, Koike E, Ootani A, Watanabe K, Koike N, Sugihara H. Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. *Cell Tissue Res*. 2003; 312(3): 281-289. DOI: [10.1007/s00441-003-0718-0](https://doi.org/10.1007/s00441-003-0718-0).
230. Sangiuliano B, Pérez NM, Moreira DF, Belizário JE. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and

control. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:821043. DOI:
10.1155/2014/821043

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Побелєнський КО**, Колот НВ, Проценко ОС, Падалко ВІ, Божок ГА, Легач ЄІ, Побелєнський ОМ. Динаміка морфологічних показників щитовидної залози у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. *Morphologia*. 2019; 13 (3): 93-98.

2. **Побелєнский КО**, Побелєнская ЛА, Легач ЕИ, Побелєнский ОН.

Сравнительное изучение результатов резекции и криодеструкции щитовидной железы в эксперименте. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020; 2(156): 286-289.

3. **Побелєнський КО**, Олефіренко ОО, Побелєнський ОМ, Легач ЄІ, Побелєнська ЛА. Порівняльні результати криодеструкції щитовидної залози у щурів лінії SHR та Вістар. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна серія медицина*. 2020; 40: 70-79.

4. **Pobelensky КО**, Kolot NV, Protsenko ES, Legach EI, Bozok GA. Morphological Parameters of the Myocardium in Spontaneously Hypertensive Rats upon Administration of Propylthiouracil. *Recent Advances in Biology and Medicine*. 2021: 1-3.

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus

5. **Побелєнский КО**, Легач ЕИ, Побелєнский ОН, Побелєнская ЛА. Биохимические показатели крови и морфологические характеристики щитовидной железы, почки и печени нормотензивных и гипертензивных крыс на фоне введения пропилтиоурацила. *Проблеми ендокринної патології*. 2020; 2(72): 111-118.

6. **Побелєнський КО**, Пахомов ОВ, Гуріна ТМ, Побелєнська ЛА, Легач ЄІ, Божок ГА. Експериментальна криодеструкція щитовидної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021;31(2): 168-179.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

7. Проценко ОС, Колот НВ, **Побеленський КО**, Побеленський ОМ, Падалко ВІ, Шаповал ОВ, Божок ГА, Легач ЄІ. Морфологічні зміни нирок у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіоурацилу. Матеріали ІІІ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології»; 2019 Жовтня 9-11; Дніпро, Україна, С. 113-115.
8. **Побеленський КО**, Легач ЄІ, Побеленський ОМ, Побеленська ЛА, Бондаренко ТП. Вивчення впливу пропілтіоурацилу на морфологічні характеристики фолікулярного епітелію щитовидної залози щурів лінії SHR. VI з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом; 2019 Червня 18-21, Яремча, Україна, С. 59.
9. **Побеленський КО**, Легач ЕІ, Побеленський ОН, Побеленская ЛА. Гистопатологические характеристики ткани щитовидной железы крыс после криовоздействия. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(2): 188.
10. **Побеленський КО**, Побеленська ЛА, Шерстюк СО, Побеленський ОМ. Морфологічні зміни фолікулярного епітелію щитоподібної залози при використанні пропілтіоурацилу у гіпертензивних щурів лінії SHR. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 215-ї річниці заснування медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2020 Березня 26-27; Харків, Україна, С. 196-197.
11. **Побеленський КО**. Гістопатологічні характеристики тканини щитоподібної залози з пропілтіоурацил-ундукованою дифузною гіперплазією після кріодеструкції. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 215-ї річниці заснування медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2020 Березня 26-27; Харків, Україна, С. 195-196.
12. **Побеленський КО**, Гуріна ТМ, Легач ЄІ, Побеленська ЛА. Вплив контрольованого нагріву на результат кріодеструкції тканини щитовидної залози. IX Міжнародна науково-практична конференція «Dynamics of the

development of world science». 2020 Травня 13-15; Ванкувер, Канада; С. 838-842.

13. **Побеленский КО**, Легач ЕИ, Божок ГА. Влияние пропилтиоурацила на некоторые морфологические характеристики щитовидной железы гипертензивных крыс линии SHR. Тези конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ ст.». 2019 Квітня 19-20; Одеса, Україна, С. 104-105.

14. Божок ГА, Гурина ТМ, **Побеленский КО**, Пахомов АВ, Ревенко ЕБ, Легач ЕИ. Разработка методологического подхода к криодеструкции патологически измененной ткани щитовидной железы с использованием контролируемого охлаждения-нагрева. Тези VI Петербургського міжнародного онкологічного форуму «Белые ночи». 2020 Червня 25-28; Санкт-Петербург, Российская Федерация; С. 171.

15. **Побелєнський КО**, Легач ЄІ. Віддалені результати кріодеструкції щитовидної залози у щурів із моделлю дифузної гіперплазії. Тези доповідей конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині». 2020; Харків, Україна; Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(3): 285.

16. **Побелєнський КО**, Колот НВ, Побелєнська ЛА. Вплив пропілтіоурацилу на кровообіг селезінки у щурів з артеріальною гіпертензією. Тези доповідей конференції «Актуальні питання сучасної медицини», присвяченої 25-ї річниці заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету ХНУ ім В.Н. Каразіна. 2021 Квітня 22-23; Харків, Україна; С. 129-131.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- 43-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (2019р., Харків, Україна);
- 44-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (2020р., Харків, Україна);
- III Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною учасю «Теорія та практика сучасної морфології» (2019 р., Дніпро, Україна);
- VI з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (2019 р., Яремча, Україна);
- щорічній конференції «Актуальні питання сучасної медицини» (2020; 2021 рр., Харків, Україна);
- VI Петербурзькому міжнародному онкологічному форумі «Белые ночи» (2020 р., Санкт-Петербург, РФ);
- X міжнародній науково-практичній конференції «Dynamics of the development of world science» (2020 р., Ванкувер, Канада);
- конференції «Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI ст.» (2019 р., Одеса, Україна).