



УДК 616.441-008.64-092.4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ГИПОПАРАТИРЕОЗА

*Ахмад Ю. А.¹, Большов А. В.¹, Неровня А. М.¹, Михальчук А. Л.², Ходосовская Е. В.¹,
Колесникова Т. С.¹, Буравский А. В.¹, Романович А. В.¹, Макаревич Ж. А.¹,
Ращинский С. М.^{1,3}, Брашевец Д. Н.³*

*¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь;

*³Учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Гипопаратиреоз в современной эндокринологии остается актуальной проблемой, в структуре которой превалирует послеоперационный вариант патологии. Заболевание существенно снижает качество жизни пациентов, может приводить к острым жизнеугрожающим состояниям (асфиксия, тетания), поражению органов и систем организма из-за нарушения кальций-фосфорного обмена и инвалидизации достаточно молодой группы трудоспособного населения. Необходимость поиска новых эффективных методов лечения требует создания модели патологии в эксперименте. На сегодняшний день существует несколько вариантов модели гипопаратиреоза у лабораторного животного, которые имеют свои преимущества и недостатки. В статье представлена методика операционной техники с использованием эндогенной флюоресценции для улучшения результатов паратиреоидэктомии и получения воспроизводимой стандартизированной экспериментальной модели гипопаратиреоза у крыс породы Wistar.

Ключевые слова: гипопаратиреоз, паратгормон, гипокальциемия, экспериментальная модель, 5-аминолевулиновая кислота, 5-АЛК, эндогенная флюоресценция, крысы Wistar.

Введение. Гипопаратиреоз (ГПТ) — это клиничко-лабораторный симптомокомплекс, развивающийся в результате снижения функции или отсутствия паращитовидных желез (ПЩЖ) и продукции паратиреоидного гормона (ПТГ) или нарушения биологического действия ПТГ, проявляющийся гипокальциемией, нарушениями нервно-мышечной проводимости, развитием остеопении/остеопороза и комплексными трофическими изменениями в организме.

Хронический (перманентный) гипопаратиреоз (продолжительностью более 6 месяцев) [1] является существенной проблемой современной эндокринологии. Заболеваемость ГПТ не уменьшается и в структуре патологии превалирует послеоперационный вариант, что сопряжено с увеличением частоты заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). При этом рак щитовидной железы по количеству новых случаев в год занимает 9-е место среди всех онкологических заболеваний в мировой статистике [2], а в Республике Беларусь общий прирост

числа новых случаев заболеваний раком щитовидной железы за 10 лет составил 21,1 % [3]. Отсутствует утвержденная заместительная гормонотерапия для данного заболевания. Лекарственная терапия является пожизненной и при неправильной дозировке препаратов может приводить к развитию патологии других органов и систем из-за нарушения кальций-фосфорного обмена (катаракта, нефролитиаз, нефрокальциноз, хроническая болезнь почек, кальцификация базальных ганглиев головного мозга, паркинсонизм). В свою очередь разработка более эффективных методов лечения ГПТ позволит вернуть к нормальному образу жизни и избежать утраты трудоспособности большой группы достаточно молодой части населения.

Большинство новых методов лечения проходят предварительно испытания еще до этапа клинических исследований. Это диктует необходимость создания модели заболевания в эксперименте у лабораторных животных или в культуре клеток.

В литературе известно несколько подходов к созданию модели ГПТ. Самым простым является хирургическое удаление паращитовидных желез у лабораторного животного под контролем зрения [4]. Однако указанный способ может быть выполнен только на достаточно крупных животных (кролики, собаки), у которых хорошо выражена сосудистая ножка паращитовидной железы, проходящая вне паренхимы щитовидной железы. Такая методика технически не применима для мелкого лабораторного животного (крысы) ввиду размеров животного и особенностей анатомического строения: щитовидная железа с паращитовидными железами формирует единый органокомплекс, что определяет невозможность выделения и лигирования паращитовидных сосудов.

Известен способ моделирования экспериментального гипопаратиреоза у крыс путем электрокоагуляции паращитовидной железы [5]. После выделения щитовидной железы и визуализации в толще ее ткани паращитовидных желез производится их диатермокоагуляция. Однако интраоперационно трудно достоверно контролировать объем поврежденной ткани паращитовидной железы, что может привести к гипертрофии сохранившихся участков в послеоперационном периоде и, как следствие, нормализации уровня паратгормона. Таким образом, предложенный способ не позволяет получить достоверную стандартизированную модель гипопаратиреоза. Также стоит отметить летальность животных, которая в первые сутки

после операции составляла 10–15 %. Это обусловлено повреждением ткани щитовидной железы и развитием тиреоидита.

Существует способ хирургического удаления паращитовидных желез у крыс под контролем зрения и использованием микрохирургической техники путем выполнения тотальной паратиреоидэктомии с одномоментной резекцией участка ткани щитовидной железы и последующим нанесением на раневую поверхность медицинского клея «Сульфакрилат» [6]. Приведенный метод не всегда позволяет удалить все паращитовидные железы у лабораторного животного, так как они могут располагаться в толще ткани щитовидной железы, что затрудняет их точную визуализацию и требует выполнения симультанной геми- или тотальной тиреоидэктомии для достижения поставленной задачи (перманентного гипопаратиреоза). Также может наблюдаться вариабельность числа паращитовидных желез (обычно их две) и их расположения [7]. Выполнение субтотальной паратиреоидэктомии при наличии aberrантных паращитовидных желез может привести к гиперплазии последних, что не позволит достичь целевой стандартизированной экспериментальной модели.

Некоторые исследователи с целью улучшения интраоперационной визуализации паращитовидных желез у животного применяли метод флуоресценции [8–11]. Для этого использовалась 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), которая является одним из предшественников гема — небелкового компонента гемоглобина (рисунок 1).

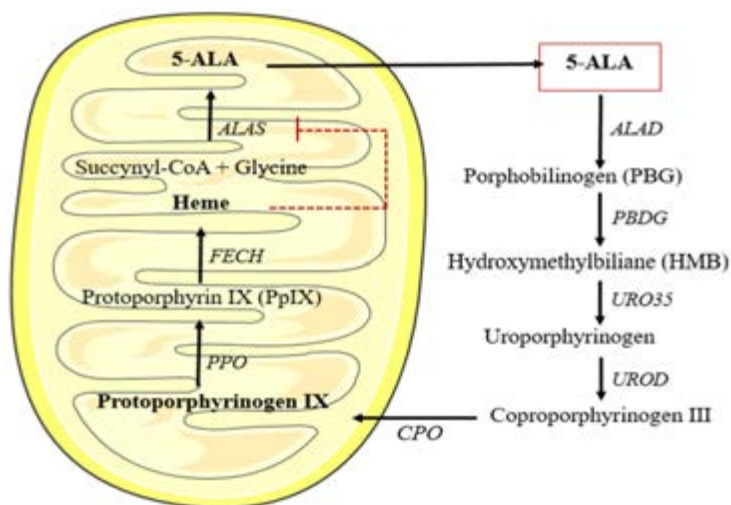


Рисунок 1 — Схема биосинтеза гема

При введении экзогенной 5-АЛК происходит гиперпродукция протопорфирина IX, последнего прекурсора в цепочке биосинтеза гема, который накапливается в парашитовидных железах в большей степени, нежели в других тканях органов шеи [8, 9]. При освещении ксеноновым источником света (длина волны 380–440 нм) протопорфирин IX испускает красную флуоресценцию [8, 10].

Таким образом, каждая из приведенных моделей ГПТ имеет свои преимущества и недостатки, что послужило основанием для разработки другого подхода к воспроизведению модели гипопаратиреоза в экспериментальном исследовании.

Цель работы — разработка способа моделирования послеоперационного гипопаратиреоза у лабораторных крыс, применение которого позволит удалять все парашитовидные железы животного с минимальной интраоперационной травмой.

Материалы и методы. Экспериментальная работа проводилась в виварии УО «Белорусский государственный медицинский университет». Исследование одобрено этическим комитетом БГМУ. Условия содержания лабораторных животных соответствовали Ветеринарно-санитарным правилам по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках, утвержденным постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21 мая 2010 г. № 63.

Модель — это система, исследование которой служит средством получения информации о другой системе (патологическом процессе). В своей работе мы придерживались следующих требований к экспериментальной модели:

1. Адекватность — это соответствие модели реальному патологическому процессу. Поэтому была использована хирургическая острая эксцизия парашитовидных желез у лабораторного животного, так как это полностью воспроизводит патологический процесс в организме пациента.

2. Точность — это степень совпадения полученных в процессе моделирования результатов с заранее установленными. За

основу были взяты клиническая картина и лабораторные показатели у пациентов с послеоперационным ГПТ.

3. Воспроизводимость — экспериментальная модель должна быть достаточно легко воспроизводимой. Для достижения этого требования был использован опыт зарубежных коллег по применению эндогенной флуоресценции.

4. Контролируемость — оценивались уровень паратгормона и общего кальция крови, а также гистологическая верификация операционного материала.

5. Целесообразная экономичность — это когда точность полученных результатов и общность решения поставленной задачи увязываются с затратами на моделирование. Оценивались не только финансовые затраты, но и время на создание модели, что актуально для хронического эксперимента, а также использование оптимального количества лабораторных животных.

Для проведения эксперимента отбирались здоровые крысы-самцы породы Wistar массой более 250 г, находившиеся на стандартном питании. Всего на этапе разработки модели послеоперационного гипопаратиреоза было прооперировано 40 крыс. На двух животных был проведен острый эксперимент, основными задачами которого являлись уточнение анатомических особенностей щитовидной и парашитовидных желез крыс, а также отработка рационального хирургического доступа к этим органам.

Остальные 38 животных были разделены на четыре группы:

1) контрольная группа (здоровые животные, которым производился забор крови для определения референтных значений ПТГ и общего кальция крови);

2) исследуемая группа 1 (выполнялось удаление комплекса щитовидная железа-парашитовидные железы с использованием микрохирургической техники);

3) исследуемая группа 2 (выполнялось билатеральное удаление парашитовидных желез с использованием микрохирургической техники);

4) исследуемая группа 3 (животным вводили АЛК, затем выполняли билатеральное удаление парашитовидных желез с использованием микрохирургической техники и интраоперационной флуоресценции).

Животным из исследуемой группы 1 оперативное вмешательство выполнялось в следующем порядке. Метод анестезии: внутрибрюшинное введение 1%-го раствора Тиопентала натрия. Фиксация на операционном столике в положении на спине. Подготовка операционного поля путем сбривания шерсти на вентральной поверхности шеи лабораторного животного, обработка раствором антисептика. Скальпелем выполнялся поперечный, слегка дугообразный разрез на передней поверхности шеи. После рассечения кожи, подкожной клетчатки и поверхностной мышцы шеи с поверхностной фасцией верхний лоскут отводился кверху и фиксировался при помощи швадержалки. Такая методика доступа позволяет оператору получить более широкое операционное поле, что облегчает последующую визуализацию структур шеи с минимальной травматизацией тканей лабораторного животного. Поочередно тупым и острым путем мобилизовались слюнные железы в бессосудистой зоне между ними и отводились в стороны или вверх. Поочередно тупым и острым путем разделялись грудино-подъязычные и грудино-щитовидные мышцы по срединной линии и отводились на держалках в верхних третях в стороны для лучшей визуализации гортани, трахеи и щитовидной железы. При помощи операционного микроскопа МБС-2 (увеличение в 2–6 раз) более детально визуализировались и точно препарировались боковые поверхности обеих долей щитовидной железы, по возможности визуализировались паращитовидные железы по вентральной поверхности верхней или средней трети долей щитовидной железы (рисунок 2).

После определения расположения ПЩЖ и оценки операционного поля на наличие aberrантных желез микрохирургическим пинцетом за капсулу подтягивалась доля щитовидной железы и поэтапно отсекалась микрохирургическими ножницами от щитовидного хряща в комплексе с паращитовидной железой. Временный гемостаз осуществлялся методом компрессии раневой поверхности стерильной марлевой салфеткой. Стабильный гемостаз достигался аппликацией на раневую поверхность гемостатической губки, что обуславливало его контролируемость и надежность. Операционная рана после вы-

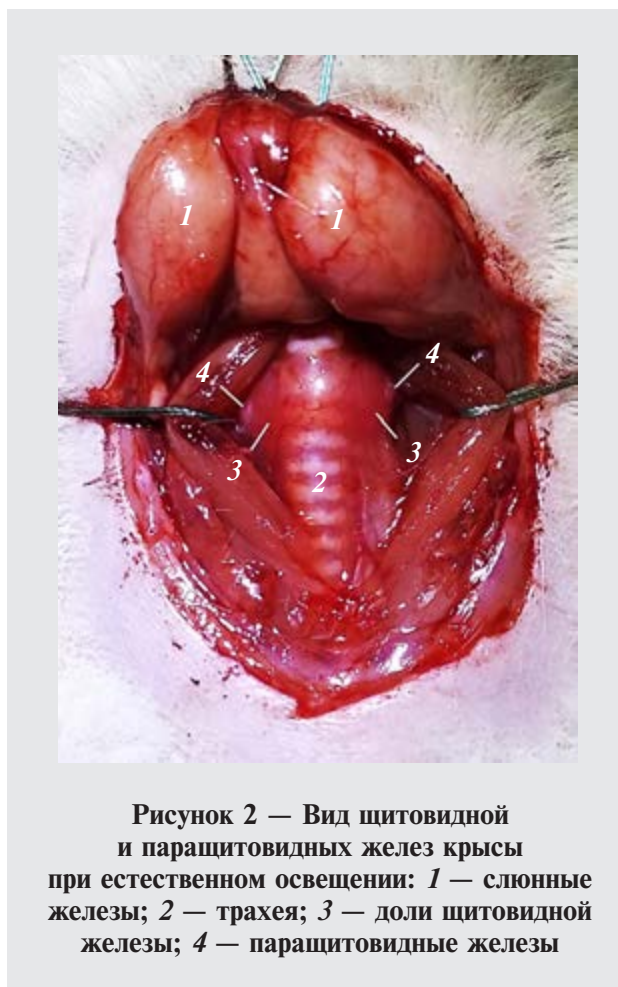
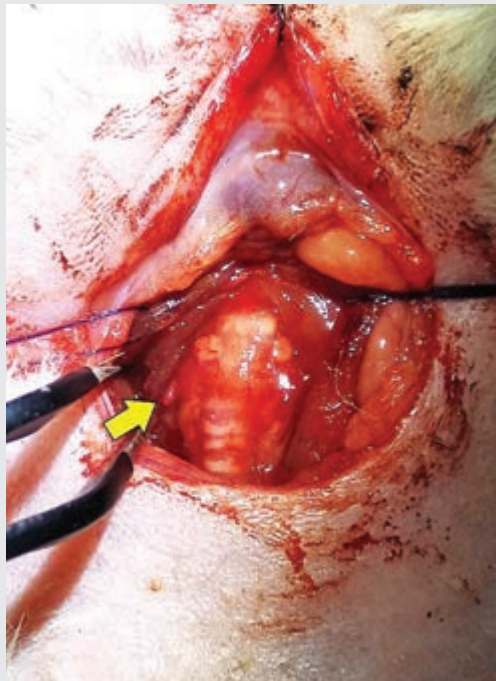


Рисунок 2 — Вид щитовидной и паращитовидных желез крысы при естественном освещении: 1 — слюнные железы; 2 — трахея; 3 — доли щитовидной железы; 4 — паращитовидные железы

полнения оперативного вмешательства послойно ушивалась.

У крыс исследуемой группы 2 подготовка операционного поля и доступ к щитовидным и паращитовидным железам осуществлялся по описанной выше методике. После определения расположения ПЩЖ и оценки операционного поля на наличие aberrантных желез микрохирургическим пинцетом за капсулу подтягивалась паращитовидная железа и отсекалась микрохирургическими ножницами с одномоментной резекцией по ее периферии 0,1 мм ткани щитовидной железы. При поверхностном расположении ПЩЖ порой удавалось удалить ее без резекции ткани щитовидной железы. При полном погружении паращитовидной железы в ткань доли щитовидной железы тотальная паратиреоидэктомия была возможна только с обязательной резекцией последней. Объем резекции доли щитовидной железы составлял от 30 до 50 %. По достижении временного

a



б

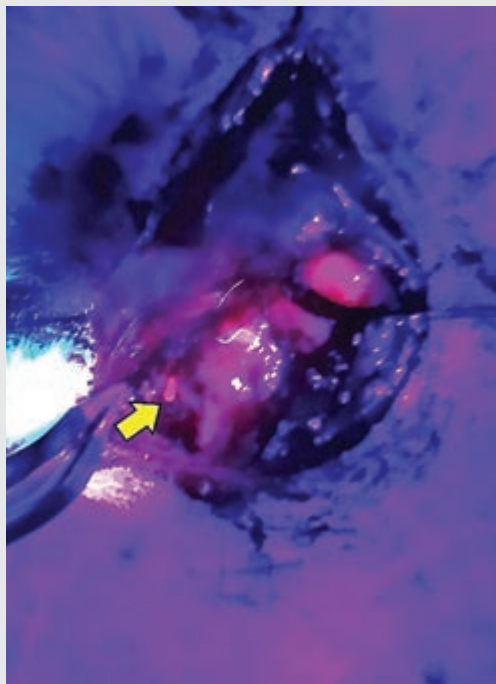


Рисунок 3 — Вид щитовидной и паращитовидных желез крысы при освещении белым (а) и фиолетовым (б) светом

гемостаза производился повторный осмотр операционного поля с целью контроля радикальности выполнения паратиреоидэктомии. Завершалось оперативное вмешательство, как описано выше.

Животным из исследуемой группы 3 за 30 мин до операции внутривенно вводилась 5-аминолевулиновая кислота в дозировке 150 мг/кг, разведенная в физиологическом растворе. Для предотвращения фототоксических реакций крысы помещались в затемненное помещение. Подготовка операционного поля и доступ к области гортани осуществлялись в описанном выше порядке. Через рассеивающую линзу в условиях полной темноты операционное поле освещалось источником света с длиной волны 405 нм (фиолетовый свет). Паращитовидные железы имели красную флуоресценцию, которая по интенсивности выше, чем у щитовидной железы и мышечной ткани [10, 11] (рисунок 3).

После определения расположения ПЩЖ и оценки операционного поля на наличие aberrантных желез паратиреоидэктомия выполнялась как описано выше в условиях освещения фиолетовым светом. Временный гемостаз и его контроль осуществлялся при освещении белым светом методом компрессии раневой поверхности стерильной марлевой салфеткой. Затем обязательно производился повторный осмотр операционного поля при освещении фиолетовым светом с целью контроля радикальности выполнения паратиреоидэктомии. Завершалось оперативное вмешательство как описано выше.

В послеоперационном периоде удаленный операционный материал подвергался гистологическому исследованию, а также проводился забор крови с последующей ее криоконсервацией для изучения уровня паратгормона и общего кальция.

Животные, включенные в исследуемые группы, выводились из эксперимента через 21 день после операции методом передозировки раствором Тиопентала натрия (сразу после взятия крови).

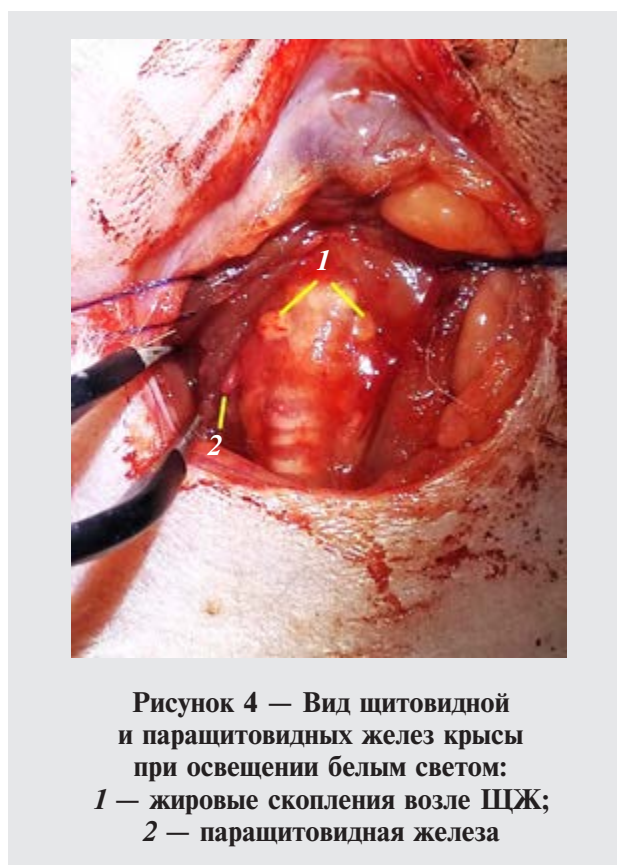
Результаты и их обсуждение. Первая проблема паратиреоидэктомии у крыс — это малый размер желез (менее 1 мм). На начальном этапе работы при проведении паратиреоидэктомии под контролем зрения без

применения микроскопической оптики (у 4 животных) было трудно обнаружить ПЩЖ, поскольку они были схожи с окружающими анатомическими образованиями (жировыми скоплениями около щитовидной железы) (рисунок 4).

Использование операционного микроскопа МБС-2 значительно облегчило процесс препарирования анатомических структур во время операции, но не решило проблему поиска и тотального удаления ПЩЖ в случае расположения последних в толще ткани щитовидной железы, что актуально у молодых крыс [6]. Применение эндогенной флуоресценции позволило улучшить визуализацию ПЩЖ в случаях расположения последних в толще долей щитовидных желез, а также контролировать радикальность удаления парашитовидных желез.

Для контроля эффективности полученной модели ГПТ оценивались следующие параметры: уровень ПТГ сыворотки крови; уровень кальция сыворотки крови; гистологическое исследование удаленного биоматериала; клинические проявления гипопаратиреоза.

При исследовании ПТГ крови крыс была обнаружена сильная, статистически значимая, корреляционная связь уровня ПТГ со сроками хранения сыворотки крови в замороженном виде. В то же время в группе,



где операция выполнена радикально, показатели паратгормона были ниже, чем в группе, где удалена только одна ПЩЖ (рисунок 5).

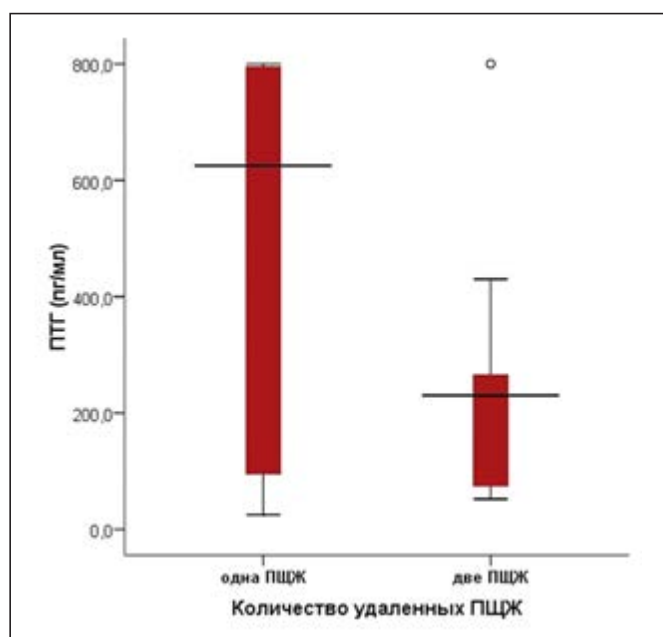


Рисунок 5 — Зависимость уровня ПТГ крови от радикальности паратиреоидэктомии

В таблице 1 представлены результаты сравнения групп по уровню общего кальция сыворотки крови. По этому показателю мож-

но косвенно судить о радикальности выполненной операции (для исследуемых групп 1, 2 и 3).

Таблица 1 — Сравнение групп по уровню общего кальция крови

Группа	<i>n</i>	Уровень общего кальция, ммоль/л	<i>H</i> -критерий Краскела – Уоллиса	<i>U</i> -критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони
Контрольная	6	2,09 [2,06–2,16]	$p = 0,02$	–
Исследуемая 1-я	10	1,56 [1,35–1,85]		$p = 0,08$
Исследуемая 2-я	4	2,13 [2,02–2,17]		$p > 0,05$
Исследуемая 3-я	10	1,53 [1,38–1,78]		$p = 0,008$

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ SPSS. Значения показателей представлены в виде *Me* [25–75], где *Me* — медиана, а межквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Статистически значимыми различия считались при значении $p < 0,05$.

По результатам проведенного статистического анализа с апостериорным попарным сравнением с контрольной группой было выявлено, что статистически значимые отличия по уровню общего кальция были получены в

исследуемой группе 3 (удаление ПЩЖ с применением микрохирургической техники и АЛК).

Гистологическое исследование операционного материала (таблица 2) помогало контролировать количество удаленных ПЩЖ и их расположение. Из приведенных в таблице результатов видно, что использование метода интраоперационной флуоресценции с целью визуализации парашитовидных желез и контроля их полного удаления позволяет более радикально выполнить хирургическое вмешательство.

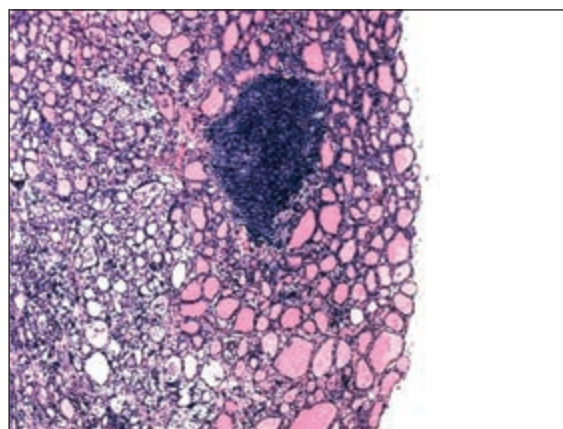
Таблица 2 — Сравнение групп по результатам гистологического исследования операционного материала

Исследуемая группа	<i>n</i>	Количество парашитовидных желез в гистологических препаратах			Критерий хи-квадрат
		не обнаружено	одна	две	
Первая	10	3	4	3	$p = 0,07$
Вторая	4	1	1	2	
Третья	10	0	3	7	

Было также установлено, что парашитовидные железы могут располагаться как на

поверхности доли щитовидной железы, так и в ее толще [6] (рисунок 6).

a



б

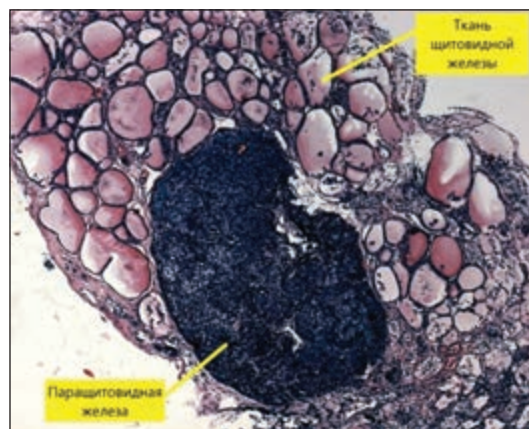


Рисунок 6 — Положение ПЩЖ в ткани доли ЩЖ: *a* — в толще ткани ЩЖ; *б* — на поверхности доли ЩЖ

На гистотопограмме представлена серия срезов гистологического материала

в виде комплекса доли ЩЖ и ПЩЖ (рисунок 7).

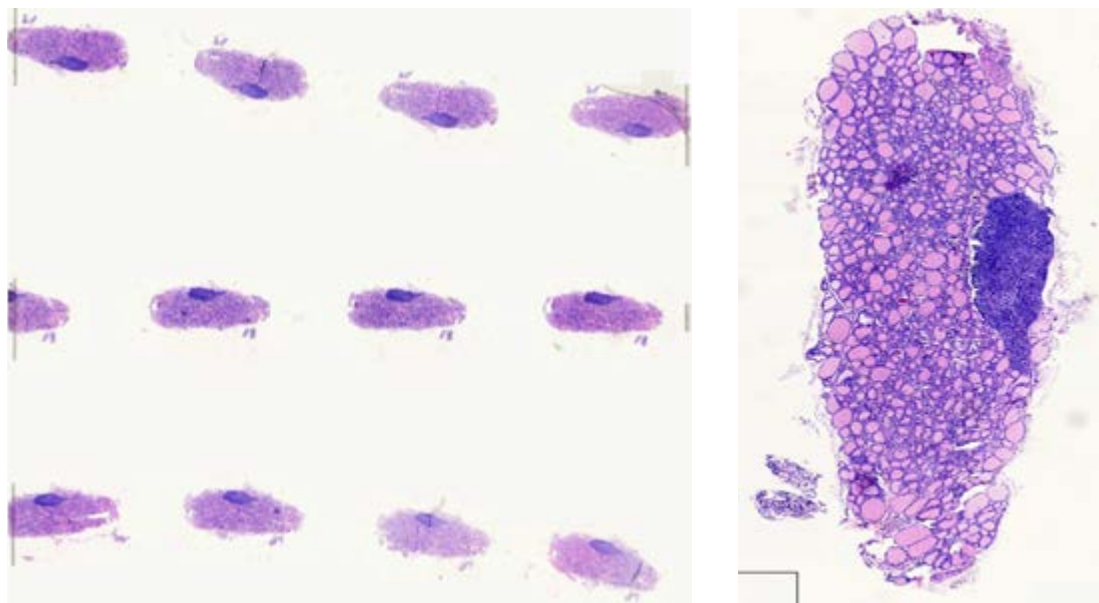


Рисунок 7 — Гистотопограмма предметного стекла с серией срезов комплекса доли ЩЖ и паращитовидной железы

Полученные результаты соответствовали данным научной литературы о том, что в норме имеется две паращитовидные железы у крыс [5, 6, 8].

Клинические проявления ГПТ при сохранении стандартного питания (Са 0,25 г/сут) отмечены не были, т. е. клиники судорог у животных в исследовании выявлено не было.

Заключение. Разработанная экспериментальная модель гипопаратиреоза соответствует всем предъявляемым к ней требованиям. Адекватность достигается хирургическим удалением ПЩЖ, что соответствует послеоперационному ГПТ. Воспроизводимость обеспечивается применением интраоперационной микроскопии и флуоресценции. Точность проверяется уровнем кальция

и паратгормона плазмы крови. Контролируемость интраоперационно обеспечивается эндогенной флуоресценцией, а после операции — уровнем кальция, ПТГ крови и морфологическим исследованием биоптата. Целесообразная экономичность — интраоперационная флуоресценция посредством точной визуализации ПЩЖ определяет использование рационального количества лабораторных животных. Таким образом, результат представленной операционной техники позволяет получить воспроизводимую контролируемую стандартизованную экспериментальную модель гипопаратиреоза с заданными свойствами, которая может быть использована для поиска путей улучшения хирургической коррекции данного заболевания.

Список цитированных источников

1. Клинический протокол «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями паращитовидных желез (взрослое население)» [Электронный ресурс] : утв. постановлением М-ва здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.2021 № 85. — Режим доступа: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/CProtokol/3КП_Диагностика_и_лечение_пациентов_с_заболеваниями_паращитовидных_желез_взр_нас_пост_МЗ_21062021_85.pdf. — Дата доступа: 11.05.2023.

2. World health organization. Cancer today [Electronic resource]. — Mode of access: <https://gco.iarc.fr/today/home>. — Date of access: 11.05.2023.

3. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных белорусского канцер-регистра за 2010–2019 гг. / А. Е. Океанов [и др.]; под ред. О. Г. Полякова. — Минск : РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. — 298 с.
4. Лопухин, Ю. М. Экспериментальная хирургия : монография / Ю. М. Лопухин. — М. : Медицина. — 1971. — 344 с.
5. Функционально-морфологическая характеристика почек и состояние антиоксидантной системы у крыс с экспериментальной гипокальциемией / И. Г. Джиоев [и др.] // *Фундаментальные исследования*. — 2013. — № 7. — С. 301–304.
6. Паратиреоидэктомия у крыс с использованием микрохирургической техники и медицинского клея Сульфакрилат / А. В. Аюшеева [и др.] // *Вестник РАМН*. — 2015. — № 3. — С. 320–327.
7. Two Techniques to Create Hypoparathyroid Mice: Parathyroidectomy Using GFP Glands and Diphtheria-Toxin-Mediated Parathyroid Ablation / R. Bi [et al.] // *J. of Visualized Experiments*. — 2017. — № 3. — С. 271–277.
8. Intraoperative Fluorescence Visualization of the Parathyroid Gland in Rats / J. Gahlen [et al.] // *Endocrinology*. — 2001. — № 11 — С. 5031–5034.
9. Fluorescent Detection of Rat Parathyroid Glands via 5-Aminolevulinic Acid / Scott A. Asher [et al.] // *The Laryngoscope*. — 2008. — Т. 118. — С. 1014–1018.
10. Kinetics of intraoperative fluorescence diagnosis of parathyroid glands / Ruediger L. Prosst [et al.] // *European J. of Endocrinology*. — 2004. — Т. 150 — С. 743–747.
11. Standardization of A Physiologic Hypoparathyroidism Animal Model / S.Y. Jung [et al.] // *PLOS ONE*. — 2016. — № 3. — С. 13.

Experimental model of hypoparathyroidism

*Akhmad Y. A.¹, Bolshov A. V.¹, Nerovnyya A. M.¹, Mikhalchuk A. L.², Khodosovskaya E. V.¹,
Kolesnikova T. S.¹, Buravsky A. V.¹, Romanovich A. V.¹, Makarevich Zh. A.¹,
Rashchinsky S. M.^{1,3}, Brashevets D. N.³*

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

*²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus;*

³City Clinical Emergency Hospital, Minsk, Republic of Belarus

Hypoparathyroidism remains a topical problem in modern endocrinology, in the structure of which the postoperative variant of the pathology prevails. The disease significantly reduces the quality of patient's life, can lead to acute life-threatening conditions (asphyxia, tetany), damage to organs and body systems due to impaired calcium-phosphorus metabolism and disability of a young group of the population. The need to search for new effective methods of treatment requires the creation of a pathology model in the experiment. To date, there are several variants of the model of hypoparathyroidism in a laboratory animal, which have their own advantages and disadvantages. The article presents an operating technique using endogenous fluorescence to improve the results of parathyroidectomy and obtain a reproducible standardized experimental model of hypoparathyroidism in Wistar rats.

Keywords: hypoparathyroidism, parathyroid hormone, hypocalcemia, experimental model, 5-aminolevulinic acid, 5-ALA, endogenous fluorescence, rats Wistar.

Поступила 19.06.2023