

ФИБРОНЕКТИН ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАК ПРИ ОДНОКРАТНЫХ И МНОГОКРАТНЫХ МЫШЕЧНЫХ НАГРУЗКАХ

БЕЗДЕНЕЖНЫХ А.В.

FIBRONECTIN OF THE THYROID GLAND IN DOGS AT SINGLE AND MULTIPLE MUSCLE LOADS

BEZDENEZHNYKH AV

Кафедра нормальной анатомии (зав. кафедрой – профессор И.Г. Стельникова) ФГБОУВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, Нижний Новгород

Известна роль фибронектина (ФН) в дифференцировке, росте, поддержании нормальной морфологии, пролиферации и апоптозе клеток, обеспечении их миграции и пространственной организации, последнее осуществляется за счет ремоделирования сосудистого и нервного обеспечения.

Цель исследования - изучить ФН щитовидной железы (ЩЖ) в ответ на различные виды мышечной деятельности. Работа выполнена на ЩЖ собак-самцов контрольной группы (16) и экспериментальных групп (67), которые имели различные режимы бега: кратковременные - несколько минут и длительные - несколько месяцев. Для выделения ФН применяли моноклональные антитела. После качественного анализа проводили оцифровку срезов правой доли органа и измеряли площадь фибронектина. Исследования выявили, что однократные тренирующие и многократные нагрузки длительностью от одного до трех месяцев не оказывали существенного влияния на ФН ЩЖ. При однократных нагрузках стартового характера с минимальным временем бега и предельных нагрузках с максимальным временем бега площади ФН были больше, чем в контрольной группе и достоверно отличались друг от друга. В этих группах ЧСС увеличивалась, выявлены гиперемия сосудистого русла ЩЖ и признаки гиперфункции органа. При стартовых нагрузках объем ФН повышался за счет накопления интраваскулярной фракции, тогда как при предельных нагрузках его внутри- и межфолликулярное накопление, возможно, обусловлено активизацией тироцитов. Таким образом, фибронектин, который традиционно рассматривается как маркер процессов новообразований щитовидной железы, может служить отражением пролиферативной

активности тироцитов при мышечных нагрузках.

Ключевые слова: щитовидная железа, фибронектин, двигательная активность

Fibronectin (FN) plays a role in the differentiation, growth, maintenance of normal morphology, proliferation and apoptosis of cells, their migration and spatial organization, including due to remodeling of the vascular and nervous supply.

The aim of the study is FN in the thyroid gland (TG) after various types of muscular activity. The control thyroid-intact male dogs (16) have no running. Six experimental groups include 67 dogs with different models of running (from a few minutes to a few months). Monoclonal antibodies were used to isolate FN. Sections of the right lobe of TG were digitizing and areas were measured after qualitative analysis. Areas of FN after single loads with middle running time and multiple loads (from one to three months) did not differ significantly from the control. Areas of FN in two groups (single loads with minimum running time and single loads with maximum running time) were more than in the control group and they are significantly different from each other. The heart rate and vascular supply of TG increased; morphologic signs of thyroid proliferation were present at dogs of these groups. Accumulation of intravascular fraction of FN was recognized at the single loads with minimum running time. Accumulation of interfollicular and intrafollicular fractions of FN was found at the single loads with maximum running time, it is possible due to the activation of thyrocytes. Thus, fibronectin, which is traditionally regarded as a marker of tumors of the thyroid gland, can serve as a reflection of proliferative activity of thyrocytes after the muscle loads.

Key words: thyroid gland, fibronectin, muscle loads

Введение. Строма ЩЖ состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани, которую формируют четыре основных типа клеток соединительной ткани (фибробласты, макрофаги,

тучные клетки и плазматические клетки) и три компонента внеклеточного матрикса (ВКМ): волокнистый – коллагены и эластин; сетчатые адгезивные белки – ламинин и фибронектин; основное вещество – протеогликаны. ВКМ является основой соединительной ткани и обеспечивает механическую поддержку клеток и транспорт химических веществ [1], [2].

Фибронектин (ФН) представляет собой гликопротеин, состоящий из двух разных субъединиц с молекулярной массой по ~250 КД, соединенных дисульфидными связями у С-концов [3] [17]. ФН продуцируется в основном фибробластами, а также макрофагами, эндотелиоцитами, глиоцитами и эпителиальными клетками [4]. ФН представлен в виде двух форм: растворимой (циркулирующей в плазме крови и синтезируемой гепатоцитами) и нерастворимой [5]. Нерастворимая форма ФН в ЩЖ присутствует в интерцеллюлярном матриксе: базальной мембране, местах межклеточных контактов [6], интерфолликулярном стромальном каркасе и в стенке сосудов органа [7], [8].

Для идентификации фибронектина используют иммунохимический анализ поли- и моноклональными антителами (АТ), при этом стенка кровеносных сосудов это то место, где реакция наиболее выражена. Моноклональные АТ специфичны к одной антигенной детерминанте и окрашивают только нерастворимую форму фибронектина [9].

ФН регулирует рост, организацию, пролиферацию и апоптоз клеток [10] [11] [12], участвует в восстановлении целостной структуры тканей [13], влияет на ремоделирование сосудов и плотность иннервации [13], оказывает стимулирующее действие на фибробласты, усиливая их миграцию и активируя синтез коллагена [15]. По данным литературы качество и эффективность этих функций связана с площадью, занимаемой фибронектином. Нарушение фибриллярных тяжей ФН ограничивает пролиферацию клеток и приводит их к гибели [16]. Традиционно увеличение объема фибронектина во ВКМ связывают с патологическими опухолевыми образованиями ЩЖ [1] [17] [18], однако, по нашему мнению, эта трактовка не столь однозначна.

Цель исследования – изучение площади нерастворимой фракции фибронектина щитовидной железы собак при различных видах двигательных нагрузок как отражение морфологических проявлений функциональной активности органа.

Материал и методы исследования. Объектом исследования являлись щитовидные железы собак. Измерения проводили на поперечном срезе центральной части правой доли ЩЖ (фиксатор 10% нейтральный формалин). Фибронектин позитивные структуры выявлялись после постановки иммуногистохимической окраски

моноклональными антителами к фибронектину человека (Dako Inc.). При данном методе окрашиванию подвергались базальная мембрана, места межклеточных контактов, интерфолликулярный стромальный каркас и строма сосудов органа.

Контрольная группа представлена 16 животными. Экспериментальная группа получала кратковременные и длительные нагрузки при динамическом контроле частоты сердечных сокращений (ЧСС).

Однократные нагрузки представлены тремя видами воздействий: тренирующего характера (нагрузки первого этапа, 8 животных); стартового характера (нагрузки второго этапа, 12 животных), предельными нагрузками (14 животных).

Многократные воздействия были в виде циклов тренировки, каждый из которых состоял из тренирующих (первый этап) и стартовых нагрузок (второй этап) и представлены тремя группами. Первая группа (12 животных) после первого этапа тренирующих индивидуально дозированных двигательных нагрузок (ИДДН) получала воздействия стартового характера. Во второй группе (10 собак) тренирующими нагрузками и стартовыми ИДДН моделировали последовательно три цикла воздействий. В третьей группе (11 животных) формировали четыре цикла.

Захвату кадров на микроскопе «Leika DMLS» камера «CCB Camera DIGITAL Косом» (увеличение 400) предшествовал качественный анализ препаратов, во время которого оценивалась локализация, расположение и ход волокон фибронектина, количество фибронектин положительных клеток. В программе Adobe Photoshop была произведена обработка фотографий с удалением артефактов и элементов, находящихся за пределами интерфолликулярных септ, т.о. анализу подвергался фибронектин, расположенный на базальной мембране, между фолликулами, в стенке сосудов. В программе Image Tools после предварительной геометрической калибровки и бинаризации изображения измерялась площадь, занимаемая ФН. На основе данных описательной статистики в программе «Statistica StatSoft, Inc., ver. 10» и U-критерия Манна–Уитни проводили сравнение групп.

Результаты исследования и их обсуждение. Средняя ЧСС в контрольной группе составила $125 \pm 6,92$ уд/мин.

Однократные воздействия. При нагрузках тренирующего характера достигалась интеграция элементов кардиореспираторного аппарата, что проявлялось стабилизацией показателей ЧСС на уровне $205 \pm 10,15$ уд/мин и временем бега $27,76 \pm 4,67$ мин. Нагрузки стартового характера, незначительные по продолжительности (время бега $8,25 \pm 0,73$ мин), оказывали существенное влияние на организм (ЧСС $201 \pm 13,47$ уд/мин).

Таблица 1

Характеристика групп при многократных воздействиях

Группа, цикл	Цикл, этап нагрузки	Количество нагрузок	Время бега (мин.)	ЧСС (уд/мин)
Первая группа 1 цикл (n=12)	1.1 этап	17,58±0,74	45,64±1,83	169±1,85
	1.2 этап	6,17 ±0,11	11,81±0,38	168±3,30
Вторая группа 3 цикла (n=10)	1.1 этап	19,1±0,96	33,49±1,26	174±2,11
	1.2 этап	8,4±0,22	10,5±0,28	172±2,47
	2.1 этап	10,7±1,3	51,11±2,31	165±1,99
	2.2 этап	8,8±0,36	10,03±0,26	172±2,34
	3.1 этап	8,5±0,78	64,02±3,46	168±2,35
Третья группа 4 цикла (n=11)	1.1 этап	15,9±0,99	29,53±0,91	179±1,86
	1.2 этап	7,08±0,31	9,8±0,19	180±2,45
	2.1 этап	12,25±0,9	43,78±1,24	178±2,05
	2.2 этап	7,5±0,34	9,82±0,23	186±2,55
	3.1 этап	10,92±0,47	56,05±1,82	180±2,17
	3.2 этап	7±0,75	9,94±0,22	184±2,78
	4.1 этап	10,5±1,25	71,3±2,56	173±2,56

У животных с предельными нагрузками (бег «до отказа») среднее время бега – 73,14±14,97 мин, средняя ЧСС во время бега – 191±6,41 уд/мин.

Многократные воздействия (Табл. 1). Для первой группы животных (первый цикл воздействий) общее количество нагрузок 23,25±0,66, после одного цикла тренирующих среднее время бега составило 45,64±1,83 мин, средняя ЧСС 169±1,85 уд/мин, после нагрузок второго этапа среднее время бега 11,81±0,38 мин, ЧСС 168±3,30 уд/мин.

Во второй группе животных третий цикл воздействий (общее количество нагрузок 55,50±2,45) приводит к росту времени бега до 64,02±3,4 мин и поддержанию средней ЧСС на уровне 168±2,35 уд/мин. Среднее время стартовых нагрузок 10,4±0,27 мин, ЧСС 172±2,38 уд/мин.

В третьей группе четвертый цикл воздействий (общее количество нагрузок 70,54±2,52) характеризуется некоторым возрастанием времени бега 71,3±2,56 мин при средней ЧСС 173,59±2,56 уд/мин. Среднее время бега при стартовых нагрузках составляло 9,85±0,25 мин, ЧСС 183,33±2,57 уд/мин.

Фибронектин позитивные структуры располагались в интерфолликулярном стромальном каркасе и были представлены в виде непрерывных и прерывистых тяжей с неровными извитыми или равномерными контурами. В зоне контакта их с базальной мембраной фолликулярных тироцитов имелись утолщения. При широком межфолликулярном пространстве тяжи располагались в основании тироцитов возле каждого из фолликулов, а пространство между ними занимали волокна соединительной ткани и/или интерстициальное

пространство. При тесном контакте фолликулов волокна фибронектина формировали единый тяж с неровными извитыми контурами. Среди стромальных волокон встречались единичные фибронектин позитивные клетки, часто, неправильной треугольной формы, их количество в препаратах было различно. Фибронектин позитивная строма в составе базальных мембран эндотелия сосудов органа для артериол и венул, обычно, формировала замкнутый контур, а у сосудов микроциркуляторного русла имела неравномерный прерывистый характер с местами истончения. Фибронектин позитивные структуры вен и венул занимали большую площадь, по сравнению с артериями и артериолами, но имели неравномерное представительство в стенке сосуда и нечеткие границы. Фибронектин стромы капсулы представлен непрерывными неравномерными тяжами, а в субкапсулярных венах имеет тонкий замкнутый контур.

Нельзя выделить принципиальные особенности фибронектин позитивной реакции стромы ЦЖ, характерной для животных какой-либо из описываемых групп. Общей тенденцией было наличие, как правило, замкнутого, непрерывного контура возле фолликулов небольшого диаметра в отличие от крупных и средних фолликулов, что, впрочем, могло быть связано с общей протяженностью длины окружности этих фолликулов. Для сосудистого русла было характерно увеличение площади ФН в стенке сосудов различного диаметра при их гиперемии.

Исследования выявили, что площадь ФН (мкм²) при однократных нагрузках стартового

характера составила $308,14 \pm 18,45$ и достоверно отличалась от контроля $99,62 \pm 7,09$ ($p < 0,01$). При нагрузках тренирующего характера площадь ФН – $90,93 \pm 5,33$, при предельных нагрузках $125,45 \pm 10,04$ (отличие от контроля, $p < 0,03$).

При многократных воздействиях: в первой экспериментальной группе первого цикла воздействия площадь ФН составила $88,26 \pm 5,21$; во второй группе – $99,55 \pm 7,67$; в третьей группе – $102,51 \pm 4,61$ мкм².

Итак, однократные тренирующие и многократные нагрузки длительностью от одного до трех месяцев не оказывали существенного влияния на ФН ЩЖ. При однократных нагрузках стартового характера с минимальным временем бега и предельных нагрузках с максимальным временем бега, площадь ФН достоверно отличалась. Нагрузки данного типа приводили увеличению ЧСС, гиперемии сосудистого русла ЩЖ, появлению признаков гиперфункции органа.

Временной диапазон сборки матрицы фибронектина определен исследованиями То W.S. и др. [19] в 10 минут.

Мы полагаем, что при предельных нагрузках (время бега $73,14 \pm 14,97$ мин) увеличение площади ФН может быть обусловлено активизацией тироцитов и это согласуется с работами Matola T. Di и др. [11] об избирательном стимулировании синтеза и накопления нерастворимого фибронектина в ЩЖ сывороткой крови.

При нагрузках стартового характера (время бега $8,25 \pm 0,73$ мин) увеличение ФН может происходить и за счет накопления интраваскулярной фракции, локализация его в составе сосудистой стенки обсуждается в работах Usenko V.S. и др. [9], Comi A.M. и др. [14], Murphy P.A., Hynes R.O. [7].

Таким образом, фибронектин, который традиционно рассматривается как маркер процессов новообразований щитовидной железы, может служить отражением и других изменений пролиферативной активности тироцитов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Nikiforov Y, Biddinger PW, Thompson LDR. *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 436 p.
2. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2015 [cited 2016 Jun 6]. 720 p. URL: <https://books.google.com/books?id=ilyCQAAQBAJ&pgis=1>
3. Pankov R, Yamada KM. *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci [Internet]. 2002 [cited 2016 Oct 10];115(Pt 20):3861–3. URL: <http://jcs.biologists.org/content/115/20/3861.long> DOI: 10.1242/jcs.00059
4. Bosman FT, Stamenkovic I. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 2003 Jul [cited 2016 Jul 19];200(4):423–8. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1437> DOI: 10.1002/path.1437
5. Graninger W, Pirich K, Derfler K, Waldhäusl W. *Plasma fibronectin and thyroid function*. J Clin Pathol [Internet]. BMJ Group; 1985 Jan [cited 2016 Jul 20];38(1):64–7. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC499073>
6. Nezi L, Greco D, Nitsch L, Garbi C. *The Role of Proteases in Fibronectin Matrix Remodeling in Thyroid Epithelial Cell Monolayer Cultures*. Biol Chem [Internet]. 2002 Jan 23 [cited 2016 Jul 19];383(1). URL: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2002.383.issue-1/bc.2002.017/bc.2002.017.xml> DOI: 10.1515/BC.2002.017
7. Murphy PA, Hynes RO. *Alternative splicing of endothelial fibronectin is induced by disturbed hemodynamics and protects against hemorrhage of the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Jul 20];34(9):2042–50. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4140979> DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303879
8. Barreto-Ortiz SF, Fradkin J, Eoh J, Trivero J, Davenport M, Ginn B, et al. *Fabrication of 3-dimensional multicellular microvascular structures*. FASEB J [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Jul 20];29(8):3302–14. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4511194> DOI: 10.1096/fj.14-263343
9. Usenko VS, Lepekhin EA, Kornilovska IN, Lyzogubov VV, Apostolov EO, Ralets IS, et al. *Immunohistochemical study of fibronectin and thyroglobulin in the thyroid gland of female rats after exposure to radioactive iodine*. Anat Rec [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1998 Dec [cited 2016 Oct 10];252(4):600–7. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0185%28199812%29252%3A4%3C600%3A%3AID-AR10%3E3.0.CO%3B2-E> DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199812)252:4<600::AID-AR10>3.0.CO;2-E
10. Illario M, Cavallo AL, Vito E Di, Mueller F, Marzano LA, Troncone G, et al. *Fibronectin-Induced Proliferation in Thyroid Cells Is Mediated by $\alpha v \beta 3$ Integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and Calcium / CaMKII Signals*. URL: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-1520>. Endocrine Society; 2005;90(5):2865–73. DOI: 10.1210/jc.2004-1520
11. Di Matola T, Mueller F, Fenzi G, Rossi G, Bifulco M, Marzano LA, et al. *Serum withdrawal-induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin interaction*. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2000 Mar [cited 2016 Jul 20];85(3):1188–93. URL: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.85.3.6425> DOI: 10.1210/

jcem.85.3.6425

12. Salzano M, Russo E, Postiglione L, Guerra A, Marotta V, Esposito S, et al. Interferon- γ inhibits integrin-mediated adhesion to fibronectin and survival signaling in thyroid cells. *J Endocrinol* [Internet]. BioScientifica; 2012 Dec 1 [cited 2016 Jul 20];215(3):439–44. URL: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JOE-12-0335>. DOI: 10.1530/JOE-12-0335

13. Zhang Y, Lin Z, Foolen J, Schoen I, Santoro A, Zenobi-Wong M, et al. Disentangling the multifactorial contributions of fibronectin, collagen and cyclic strain on MMP expression and extracellular matrix remodeling by fibroblasts. *Matrix Biol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Jul 20];40:62–72. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X14001711>. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.09.001

14. Comi AM, Weisz CJC, Highet BH, Skolasky RL, Pardo CA, Hess EJ. Sturge-Weber syndrome: altered blood vessel fibronectin expression and morphology. *J Child Neurol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2016 Jul 20];20(7):572–7. URL: <http://jcn.sagepub.com/content/20/7/572.long>

15. Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2016 Jul 20];49(11):2024–36. URL: <http://www.rheumatology.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/rheumatology/keq208>.

DOI: 10.1093/rheumatology/keq208

16. Vitale M, Di Matola T, Bifulco M, Casamassima A, Fenzi G, Rossi G. Apoptosis induced by denied adhesion to extracellular matrix (anoikis) in thyroid epithelial cells is p53 dependent but fails to correlate with modulation of p53 expression. *FEBS Lett* [Internet]. 1999 Nov 26 [cited 2016 Jul 20];462(1–

2):57–60. URL: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(99\)01512-4](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(99)01512-4). DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01512-4

17. Sponziello M, Rosignolo F, Celano M, Maggisano V, Pecce V, De Rose RF, et al. Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2016 Jul 20];431:123–32. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720716301563>. DOI: 10.1016/j.mce.2016.05.007

18. Абросимов, А. Ю. Клетки доброкачественных и пограничных опухолей щитовидной железы экспрессируют маркеры злокачественности/А. Ю. Абросимов, Н. Ю. Двинских, А. В. Сидорин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т. 160, № 11. - С. 652-656

Abrosimov, A. Ju. Kletki dobrokachestvennyh i pogranych opuholej shhitovidnoj zhelezy jekspressirujut markery zlokachestvennosti/A. Ju. Abrosimov, N. Ju. Dvinskih, A. V. Sidorin // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. - 2015. - T. 160, № 11. - S. 652-656

19. To WS, Midwood KS, Lorenz H, Longaker M, Midwood K, Williams L, et al. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* [Internet]. BioMed Central; 2011 [cited 2016 Sep 6];4(1):21. URL: <http://fibrogenesis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-1536-4-21>. DOI: 10.1186/1755-1536-4-21

Авторская справка:

Безденежных Андрей Вячеславович – к.м.н, доцент кафедры нормальной анатомии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России, г. Нижний Новгород, ул. Космонавта Комарова, д. 16, кв. 58, 603076; (8)910-878-91-41; E-mail: natom311@gmail.com