

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Царева, О.А., Рахманкина М.А., 2016
УДК 611.444-018.1:616.441-008.64

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИРОЦИТОВ
И С-КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ГИПОФУНКЦИИ,
ИНДУЦИРОВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ АКТИНОМИЦИНА D**

О.А. Царева, М.А. Рахманкина

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, ул. Высоковольтная, 9,
390026, г. Рязань, Российская Федерация

В экспериментах на лабораторных животных с помощью радиоиммунологического и электронномикроскопического методов исследования изучены тиреоидный статус и ультраструктура тироцитов и С-клеток щитовидной железы при гипофункции индуцированной введением актиномицина D. На тканевом уровне получено подтверждение гипофункции щитовидной железы. Проведены морфометрические исследования ядерного аппарата и органелл цитоплазмы тироцитов и С-клеток. Доля инертного гетерохроматина в ядре снижается, ядрышки уменьшаются в размере и утрачивают ячеистую структуру. Отмечаются изменения со стороны вакуолярно-лизосомальной системы. Установлено наличие синергизма в действии актиномицина D и трийодтиронина на тироциты. Выявлены ультраструктурные изменения, которые нарушают биосинтез и транспорт йодтиронинов в тироцитах и биосинтез кальцитонина и соматостатина в С-клетках.

Ключевые слова: тироциты, С-клетки, крысы, гипофункция, актиномицин D, трийодтиронин.

**MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF THYROID GLAND
THYROCYTES AND C-CELLS IN HYPOTHYROIDISM
INDUCED BY ACTINOMYCIN D ADMINISTRATION**

O.A. Tsareva, V.A. Rakhmankina

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov,
Vysocovoltynaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

Thyroidin status and thyrocyte ultrastructure of thyroid gland in case of hypofunction induced by introduction of aktinomicin D were studied in the course of experiments on laboratory animals using radioimmunologic and electronmicroscopic techniques. Confirmation of hypothyroidism was obtained at the tissue level. Morphometric studies of the nuclear apparatus and organelles of thyrocytes and C-cells cytoplasm were held. The proportion of inert heterochromatin in the nucleus is reduced, and the nucleoli decrease in size and lose their cellular structure. Changes occur in vacuolar-lysosomal system. The presence of synergism in the action of actinomycin D and triiodothyronine on thyrocytes. The

ultrastructural changes violating biosynthesis and triiodothyronine transportation in thyrocytes and biosynthesis of somatostatin and calcitonin in C-cells were discovered.

Keywords: *thyrocytes, C-cells, rats, hypothyroidism, actinomycin D, triiodothyronine.*

В последние десятилетия интерес к изучению структурных и функциональных особенностей желез внутренней секреции неизменно растет, не только в связи с выявлением новых механизмов влияния эндокринной системы на жизненно важные процессы живых организмов, но и из-за ухудшения экологической ситуации в мире, приводящей к тому, что изменяется роль гормонов и гормоноподобных веществ в регуляции метаболических процессов. Известно, что нарушение процессов гормональной регуляции приводит к серьезным последствиям с развитием тяжелых эндокринных заболеваний [1, 2, 3, 4]. Многообразие и сложность эндокринной регуляции и вариабельность патологии делают актуальными исследования в данной области.

Материалы и методы

Работа выполнена на 20 половозрелых белых нелинейных крысах самцах массой 210-230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Первой группе животных вводили актиномицин D (AmD) (Renal) четырехкратно в/брюшинно в разовой дозе 0,2 мг/кг с интервалом в 12 часов. Контролем служили крысы, которым вводили в те же сроки растворитель 5% этанол. Второй группе животных на фоне инъекций экзогенного трийодтиронина (T_3) (Sigma) в разовой дозе 100 мкг в течение 7 суток на 6, 7 сутки от начала эксперимента осуществляли введение той же дозы AmD. Контролем служили крысы, которым вводили в те же сроки растворитель 0,025 М NaOH и растворитель 5% этанол. Эвтаназию крыс осуществляли углекислым газом в течение 15-20 мин через 24 часа от последней инъекции [5].

Уровень гормонов исследовался в ЦНИЛ РязГМУ в день забоя. Кровь отбиралась из брюшной аорты и отстаивалась до получения сыворотки. Уровень T_3 , T_4 , ТТГ измеряли радиоиммунным методом.

Для исследования на тканевом уровне изготавливали гистологические препараты, которые окрашивали гематоксилин-эозином.

Исследования на клеточном уровне проводили под электронным микроскопом ЭМ-125К. Кусочки щитовидной железы размером 1x1 мм фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида при 4°C 4 часа. Материал обрабатывали по стандартной методике, изготавливали ультратонкие срезы и изучали при увеличении 6000, 10000, 15000.

Обработку информации для ультраструктурной морфометрии проводили на компьютере с помощью автоматизированной системы для измерения колориметрических, денситометрических и морфометрических параметров медико-биологических объектов [6, 2, 7]. По каждой серии опытов обрабатывали по 10 электронограмм. Определяли среднюю относительную площадь ядра, ядрышка, эухроматина и гетерохроматина. Вычисляли ядрышко-ядерное соотношение и соотношение эухроматина и гетерохроматина в ядре. Ультраструктурную морфометрию электронно-плотных гранул проводили на электронограммах при увеличении 10000. По каждой серии опытов обрабатывали по 10 электронограмм.

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики. Вычисления проводились на компьютере с использованием прикладных программ «Statistic», «SigmaPlot». Анализировали характер распределения данных. Применялась параметрическая описательная статистика, рассчитывались: среднее (M) и среднеквадратическая ошибка (m). Достоверность различий определяли по t -критерию Стьюдента. Вероятность $p < 0,05$ считали достаточной для вывода о достоверности различий между вариационными рядами.

Результаты и их обсуждение

Радиоиммунологическое исследование уровня тиреоидных гормонов и тиреотропина в сыворотке крови животных первой и второй группы указывает на то, что введение АмД по описанной схеме вызывает гипофункцию щитовидной железы. Для первой группы наиболее выраженное изменение претерпевает концентрация ТТГ, при этом обнаруживается достоверное понижение уровня гормона

на 57,9% по сравнению с контролем. Уровень T_4 снижается на 38,85%, уровень T_3 снижается менее выражено – на 4,54%. Для второй группы уровень ТТГ снижается в 17 раз, уровень T_4 снижается на 49%, уровень T_3 снижается менее выражено – на 52%. Полученные данные свидетельствуют о значительном понижении секреции ТТГ и одновременном выраженном торможении образовании T_3 и T_4 (табл. 1).

Таблица 1

Изменение тиреоидного статуса крыс при введении актиномицина D и актиномицина D на фоне курсового введения трийодтиронина

Серия	Масса тела, г $M \pm m$	Масса железы, г $M \pm m$	Концентрация гормонов в сыворотке крови		
			T_3 , нмоль/л $M \pm m$	T_4 , нмоль/л $M \pm m$	ТТГМЕД/л $M \pm m$
Контроль (n=10)	207 \pm 3,28	30,4 \pm 0,92	1,977 \pm 0,044	28,86 \pm 1,253	1,524 \pm 0,015
АмД (n=10)	191,8 \pm 2,44 $p < 0,01$	28 \pm 1,23	1,098 \pm 0,07 $p < 0,001$	17,66 \pm 2,049 $p < 0,05$	0,14 \pm 0,03 $p < 0,001$
АмД+ T_3 (n=10)	181,5 \pm 5,07 $p < 0,01$	25,8 \pm 1,65	0,958 \pm 0,09 $p < 0,001$	14,68 \pm 1,09 $p < 0,01$	0,09 \pm 0,01 $p < 0,001$

Гипофункциональное состояние щитовидной железы подтверждается при гистологическом исследовании. На препаратах щитовидной железы животных первой и второй группы отмечается преобладание мелких фолликулов, с выраженной резорбцией коллоида. Сеть капилляров в рыхлой волокнистой соединительной ткани, окружающей фолликулы, хорошо развита. С-клетки локализованы в центральных участках железы, в прослойках соединительной ткани между фолликулами, или в стенке фолликулов и имеют типичную полигональную или вытянутую форму. Средняя площадь С-клеток достоверно не изменяется.

При морфометрическом исследовании щитовидной железы животных первой группы отмечается достоверное уменьшение высоты тиреоидного эпителия приблизительно на 25%. Показатель функциональной активности щитовидной железы – индекс накопления достоверно увеличивается на 36%. Наиболее существенные изменения, свидетельствующие о гипофункции щитовидной железы, отмечаются при проведении соответствующих исследований для животных второй группы. Отмечается достоверное уменьшение высоты тиреоидного эпителия приблизительно на 32%, индекс накопления достоверно увеличивается на 68% (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрическая характеристика функциональной активности фолликула щитовидной железы при экспериментальной гипофункции

Серия	Средняя площадь фолликула, мкм ² $M \pm m$	Высота эпителия фолликула, мкм $M \pm m$	Индекс накопления $M \pm m$
Контроль (n=10)	1701,2 \pm 15,498	1,3 \pm 2,058	1,76 \pm 0,068
АмД (n=10)	1556,1 \pm 10,651	0,95 \pm 1,581 $p < 0,05$	2,40 \pm 0,272 $p < 0,01$
АмД+ T_3 (n=10)	1510,3 \pm 12,851	0,89 \pm 1,595 $p < 0,05$	2,96 \pm 0,083 $p < 0,01$

При электронно-микроскопическом исследовании в тироцитах и С-клетках у животных на фоне введения АмД ядра приобретают извилистые, неровные контуры. Отмечается расширение перинуклеарного пространства. Возрастает количество компактизированного хроматина, который в виде глыбок располагается под кариолеммой. По данным морфометрии величина соотношения площадей эухроматина и гетерохроматина в тироцитах и С-клетках статистически достоверно уменьшается почти в два раза (табл. 3). Наружная мембрана кариолеммы практически лишена рибосом. Ядрышки уменьшены в размерах, утрачивают ячеистую структуру, приобре-

тают вид гомогенных телец овальной или округлой формы. При этом статистически достоверно на 30% уменьшается ядерно-ядрышковое соотношение. Полученные результаты указывают на то, что точкой приложения токсического эффекта АмД является ядерный аппарат тироцитов и С-клеток. Эти ультраструктурные изменения в ядерном аппарате тироцитов влияют на вакуолярно-лизосомальную систему, нарушают биосинтез и транспорт йодтиронинов, в С-клетках нарушается синтез олигопептидных гормонов [8]. Однако, сочетанное введение Т₃, по-видимому, не оказывает дополнительного действия на ядерный аппарат как тироцитов, так и С-клеток.

Таблица 3

**Ультроструктурная морфометрия ядерного аппарата клеток
щитовидной железы при введении актиномицина D и актиномицина D
на фоне курсового введения трийодтиронина**

Серия	Тироциты		С-клетки	
	Ядрышко-ядерное соотношение, М±m	Соотношение площадей эу- и гетерохроматина, М±m	Ядрышко-ядерное соотношение, М±m	Соотношение площадей эу- и гетерохроматина, М±m
Контроль (n=10)	0,048±0,05	1,697±0,155	0,038±0,002	1,712±0,05
АмД (n=10)	0,033±0,004 p<0,05	0,88±0,05 p<0,001	0,028±0,05 p<0,05	0,81±0,05 p<0,001
АмД+ Т ₃ (n=10)	0,027±0,002 p<0,01	0,806±0,062 p<0,01	0,029±0,01 p<0,01	0,809±0,01 p<0,01

Сходные ультраструктурные изменения обнаружены при изучении ультраструктуры гепатоцитов крыс и клеток гипокампа при введении данного препарата [4, 8]. По-видимому, причиной прекращения синтеза РНК, а в следствие этого и биосинтеза белка в клетке с одной стороны может служить отделение хроматина от ядрышка. С другой – способность АмД образовывать комплексы с гуанин содержащими участками ДНК клеток, что подавляет матричную активность последней. Подавляющее действие на РНК обусловлено ингибированием РНК-полимеразы посредством связывания поверхностей матрицы.

На ультраструктурном уровне в цитоплазме тироцитов первой группы жи-

вотных определяется уменьшение гранулярной эндоплазматической сети с уменьшением плотности расположения рибосом на ее мембранах. В ряде тироцитов обнаруживаются митохондрии с частично редуцированными кристами. Комплекс Гольджи представлен отдельными диктиосомами и единичными микропузырьками, расположенными в цитоплазме в виде мелких групп и окруженными свободными рибосомами. Уменьшается количество и величина микроворсинок на апикальной поверхности. Коллоидные капли немногочисленны. Обнаруживается уменьшение количества первичных лизосом с преимущественной их локализацией в среднем отделе цитоплазмы (в контроле

в апикальном отделе). Увеличивается количество вторичных лизосом с гомо- и гетерогенным содержимым. Данные изменения в вакуолярно-лизосомальной системе свидетельствуют о нарушении процессов гормонального синтеза. Базальная мембрана содержит незначительное число инвагинаций. Цитоплазма эндотелиальных клеток сосудов микроциркуляторного русла практически лишена пиноцитозных пузырьков, что свидетельствует о низкой пиноцитозной активности. При исследовании кальцитониноцитов первой группы животных отмечается частичная редукция гранулярной эндоплазматической сети, Комплекс Гольджи частично редуцирован. Число митохондрий в клетке практически не изменяется. Отмечается уменьшение числа электронно-плотных гранул в цитоплазме на – 17,8%, но их содержимое остается мелкозернистым и гомогенным как в норме.

В тироцитах второй группы животных наблюдаются более выраженные гипофункциональные изменения. Отмечается практическое отсутствие гранулярной эндоплазматической сети, а агранулярная эндоплазматическая сеть вакуолизована. Свободные рибосомы в цитоплазме тироцитов немногочисленны. Комплекс Гольджи практически редуцирован. Между вакуолизованными канальцами эндоплазматической сети обнаруживаются очаговые скопления мелких митохондрий с неплотно упакованными кристами. Степень активности трансцеллюлярного обмена веществ между фолликулами щитовидной железы и компонентами микроциркуляторного русла находится на весьма низком уровне, о чем свидетельствует гладкий рельеф базальной мембраны большинства фолликулов и незначительное число пиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиальных клеток. Полученные результаты указывают на наличие синергизма в действии АмД и Т₃, что весьма вероятно, если принимать во внимание способность дан-

ного гормона ингибировать синтез ТТГ на уровне транскрипции. В С-клетках второй группы животных гипофункциональные изменения не усиливаются по сравнению с первой группой. На фоне частичной редукции гранулярной эндоплазматической сети уменьшается число и плотность распределения рибосом на ее мембранах по сравнению с контролем. В околоядерной зоне отмечаются хорошо выраженные канальцы гладкой эндоплазматической сети. Комплекс Гольджи частично редуцирован. Число митохондрий в клетке практически не изменяется, распределение их в цитоплазме равномерно. Отмечается уменьшение числа секреторных гранул, аргофилия и метахроматизация цитоплазмы снижается.

Выводы

Введение актиномицина D вызывает в ядрах клеток щитовидной железы увеличение доли инертного гетерохроматина и сегрегацию ядрышек. Эти ультраструктурные изменения в ядерном аппарате тироцитов влияют на вакуолярно-лизосомальную систему, нарушают биосинтез и транспорт йодтиронинов и, в конечном итоге, ведут к гипофункции щитовидной железы, характеризующейся понижением гормонального уровня в крови экспериментальных животных. При сочетанном введении актиномицина D и трийодтиронина отмечается тенденция к усилению гипофункциональных изменений, что может свидетельствовать о наличии синергизма в действии этих веществ на тироциты.

Введение актиномицина D вызывает сходные изменения в ядерном аппарате С-клеток. Происходит ингибирование биосинтеза белка на уровне транскрипции, которое нарушает биосинтез кальцитонина и соматостатина, нарушается синтез, накопление и декарбоксилирование различных биогенных аминов, которые способны к местной регуляции кальцитонина. При сочетанном введении актиномицина D и трийодтиронина в С-клетках не отмечается тенденция к усилению гипофункциональных изменений.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Андреева И.В., Виноградов А.А. Перспективы использования современных методов визуализации в морфологических и экспериментальных исследованиях // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2015. №4. С. 17-26.
2. Андроник В.И., Мельник Б.Е. Качественно-количественная характеристика структуры тиреоцитов (при экспериментальной гипер- и гипопункции). Кишинев: Штиинца, 1986. 136 с.
3. Аристархов В.Г., Данилов Н.В. Отдаленные результаты оперативного лечения доброкачественных образований щитовидной железы у пожилых пациентов // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. №1. С. 103-106.
4. Beekman R.E., van Hardeveld C., Simonides W.S. On the mechanism of the reduction by thyroid hormone of beta-adrenic relaxation rate stimulation in the rat heart // Biochem J. 1989. Vol. 259, №1. P. 229-236.
5. Полоз А.И., Финогенов А.Ю. Методические указания по гуманной эвтаназии животных. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2008. 45 с.
6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. Москва: Медицина, 1990. 84 с.
7. Титова М.А. Морфофункциональная характеристика С-клеток щитовидной железы в онтогенезе и эксперименте: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саранск, 2003. 17 с.
8. Агладзе А.Г., Челидзе П.В. Ультраструктура ядрышка и ядрышкообразующих районов при действии ингибиторов синтеза РНК (актиномицин D и амфотерицин). В кн.: Реактивность клеточных органелл: материалы симпозиума (Тбилиси 19-21 апр.). Тбилиси, 1984. С. 17-22.

References

1. Andreeva IV, Vinogradov AA. Perspektivy ispol'zovanija sovremennyh metodov vizualizacii v morfologicheskikh i jeksperimental'nyh issledovanijah [Perspective of use of modern imaging techniques in morphologic and experimental studies]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)* [Science of young (Eruditio Juvenium)]. 2015; 4: 17-26.
2. Andronik VI, Mel'nikB E. Kachestvenno-kolichestvennaja harakteristika struktury tireocitov (pri jeksperimental'noj giper- i gipofunkcii) [Qualitative and quantitative characterization of the structure of thyrocytes (in experimental Hyper- and hypofunction)]. Kishinev: Shtiintsa; 1986. 136 p.
3. Aristarhov VG, Danilov NV. Otdalennye rezul'taty operativnogo lechenija dobrokachestvennyh obrazovanij shhitovidnoj zhelezy u pozhylyh pacientov [Long-term results of surgical treatment of benign lesions of the thyroid gland in elderly patients]. *Rossiyskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2014; 1: 103-106.
4. Beekman RE, van Hardeveld C, Simonides WS. On the mechanism of the reduction by thyroid hormone of beta-adrenic relaxation rate stimulation in the rat heart. *Biochem J.* 1989; 259 (1): 229-236.
5. Poloz AI, Finogenov AJu. Metodicheskie ukazaniya po gumannoj jevtanazii zhivotnyh [Guidelines for humane euthanasia of animals]. Minsk: RUE «Institute of experimental veterinary medicine named. S.N. Wirellessrage»; 2008. 45 p.
6. Avtandilov GG. Medicinskaja morfometrija: rukovodstvo [Medical morphometry: guide]. Moscow: Medicine; 1990. 84 p.
7. Titova MA. Morfofunkcional'naja harakteristika S-kletok shhitovidnoj zhelezy v ontogeneze i jeksperimente: avto-ref. dis. ... kand. biol. nauk [Morpho-

- functional characteristic of thyroid C-cell ontogenesis and experiment: abstract. dis. ... cand. biol. sciences]. Saransk; 2003. 17 p.*
8. Agladze AG, Chelidze PV. Ul'trastruktura jadyryshka i jadyryshkoobrazujushhih rajonov pri dejstvii ingibitorov sinteza RNK (aktinomicin D i amfotericin). V kn.: *Reaktivnost' kletochnyh organell: materialy simpoziuma*. In: Ultrastructure of the nucleolus and NORS regions in dataii inhibitors of RNA synthesis (actinomycin D and amphotericin) [*Reactivity cell organelles: proceedings of the: symposium*] (Tbilisi, 19-21 apr.). Tbilisi; 1984. p. 17-22.

Царева О.А. — к.б.н., доцент кафедры гистологии и биологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: tsareva.oksana1966@yandex.ru

Рахманкина М.А. — ассистент кафедры гистологии и биологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.