

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Рахманкина М.А., Царева О.А., 2016
УДК 611.441-018.1:616.432-089.87

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ С-КЛЕТОК
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ГИПОФИЗЭКТОМИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ**

М.А. Рахманкина, О.А. Царева

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

Изучена ультраструктура С-клеток щитовидной железы у гипофизэктомированных крыс. На ультраструктурном уровне проведены морфометрические исследования ядерного аппарата и органелл цитоплазмы С-клеток. Исследовалось ядерно-ядрышковое соотношение и соотношение эу- и гетерохроматина. Увеличивается площадь эухроматина в ядре. Для изучения энергетического компартмента С-клеток подсчитывали сумму крист в митохондриях и среднюю площадь митохондрий и на основе морфометрических данных вычисляли коэффициент энергетической эффективности. Увеличивается число митохондрий в клетке. В митохондриях увеличивается количество крист. Коэффициент энергетической эффективности возрастает. Преобладают дегранулированные формы С-клеток. Выявлены ультраструктурные изменения, которые свидетельствуют о гиперфункциональном состоянии С-клеток на фоне выраженного угнетения тиреоидной гормональной функции.

Ключевые слова: С-клетки, крысы, гипофункция, гипофизэктомия.

**THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE C-CELLS
OF THE THYROID GLAND IN HYPOPHYSECTOMIZED ANIMALS**

V.A. Rakhmankina, O.A. Tsareva

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

The ultrastructure of the C-cells of the thyroid gland in hypophysectomized rats was studied. Morphometric studies of the nuclear apparatus and cytoplasm with organelles C-cells were held at the ultrastructural level. Nuclear-nucleolar ratio and the ratio of euchromatin and heterochromatin were studied in experiment. Area euchromatin increased in the nucleus. The amount of cristae in mitochondria and the average area of mitochondria were estimated to study the energy of C-cells and the energy efficiency ratio compartment was calculate on the basis of morphometric data. The number of mitochondria is increased in the cell. The number of cristae is increased in mitochondria. The energy efficiency ratio compartment increases. Degranulated form of C-cells predominant. The ultrastructural changes indicating C-cells hyperfunctional condition on the background of the thyroid hormone function were discovered.

Keywords: cells, rats, hypothyroidism, hypophysectomy.

Проблеме морфофункционального состояния щитовидной железы при различных патологических процессах уделяется внимание многими авторами [1, 2, 3, 4]. Это связано с высокой значимостью тиреоидных гормонов в поддержании гомеостаза организма, лабильностью щитовидной железы при воздействии эндо- и экзогенных факторов. При этом большинство авторов уделяют внимание изучению тироцитов щитовидной железы, упуская из внимания ее С-клеточный аппарат. Тесная структурная связь фолликулярных и парафолликулярных клеток остается не расшифрованной как в морфологических деталях, так и в функциональном аспекте. Представляется интересным изучение С-клеток у гипопизэктомированных животных на фоне атрофических изменений в структуре щитовидной железы.

Одним из показателей функциональной активности С-клеток является уровень и особенности их гранулярного насыщения. Описано четыре типа парафолликулярных клеток, находящихся на различных стадиях секреторного цикла [5]:

- отсутствие дегрануляции (цитоплазма целиком заполнена аргирофильными гранулами), что отражает гипопункциональное состояние С-клеток;
- гранулы выявляются в области тироцитарного полюса клетки, что служит признаком экспрессии гормонов в кровь, то есть эндокринной секреции;
- основная масса секреторных гранул сконцентрирована на сосудистом полюсе С-клетки, что говорит о выделении биологически активных веществ в тироцитарном направлении и характерно для паракринового вида секреции;
- дегранулированные формы, являющиеся максимально активными в функциональном отношении; при этом одновременно происходит как эндокринная, так и паракриновая секреция.

Материалы и методы

Работа выполнена на 15 половозрелых белых нелинейных крысах самцах

массой 210-230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Гипофизэктомию выполняли стереотаксическим трансурикулярным методом в модификации П.А. Чумаченко. За 30 минут до операции животные получали подкожную инъекцию раствора ампициллина и оксациллина (ампиокс) (100 мг/кг). Премедикацию осуществляли атропином 0,05 мг/кг п/к, в/м за 30 мин до вмешательства. Ингаляционный наркоз проводили при помощи диэтилового эфира. Животное помещали под небольшой колпак, куда клали ватку, смоченную эфиром, и следили за наступлением наркоза [6]. У крысы надрезали козелок уха, голову фиксировали в станок при помощи металлических кронштейнов, входящих в наружный слуховой проход. Через специальный проводник в правый слуховой проход вводилась игла, проникающая в область турецкого седла. Содержимое отсасывали шприцем, после чего полость промывали раствором диоксида. После операции крысы содержались в лаборатории при температуре 25°C. Эвтаназию крыс осуществляли углекислым газом в течение 15-20 мин на 14 день и осуществляли ревизию полости турецкого седла [7]. Признаков неполного удаления гипофиза не обнаружено. Контролем служили крысы, у которых начальные этапы операции (введение иглы) выполняли аналогично, но содержимое полости турецкого седла не отсасывали. В послеоперационном периоде летальность составила 10%.

Для исследования на тканевом уровне изготавливали гистологические препараты по традиционной методике, и окрашивали их гематоксилин-эозином.

Исследования на клеточном уровне проводили под электронным микроскопом ЭМ-125К. Кусочки щитовидной железы размером 1x1 мм фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида при 4°C 4 часа. Промывку материала осуществляли в фосфатном буфере pH 7,4 трижды, в течение полутора часов. Постфиксацию прово-

дили в 1% растворе оксида осмия, дегидратацию – в спиртах возрастающей концентрации. Фиксированные кусочки заливали смесью аралдит-эпона. Изготавливали ультратонкие срезы, которые помещали на медные сеточки и окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Изучали материал с помощью электронного микроскопа 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 [8, 9, 10]. По каждой серии опытов обрабатывали по 10 электронограмм (ЭГ). Определяли среднюю относительную площадь ядра, ядрышка, эухроматина и гетерохроматина. Вычисляли ядрышко-ядерное соотношение и соотношение эухроматина и гетерохроматина в ядре. Морфометрию энергетического компартамента проводили при увеличении 10000. По каждой серии опытов обрабатывали по 10 электронограмм (ЭГ). Проводили подсчет количества митохондрий (мит) и крист в 1 митохондрии. Вычисляли сумму крист (СК) в 1 ЭГ. Вычисляли площадь 1 митохондрии в $\mu\text{км}^2$, суммарную площадь митохондрий (СПМ) в 1 ЭГ в $\mu\text{км}^2$. По формуле рассчитывали коэффициент энергетической эффективности (КЭЭМ).

$$\text{КЭЭМ} = \frac{\text{СК (опыт)} \times \text{СПМ (опыт)}}{\text{СК (опыт)} \times \text{СПМ (опыт)}} \times 100\%$$

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики. Вычисления проводились на компьютере с использованием прикладных программ «Statistic», «SigmaPlot». Полученные данные можно считать нормально распределенными. Применялась параметрическая [среднее (М), среднеквадратическая ошибка (m)] описательная статистика. 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

Гипофункциональное состояние щитовидной железы на тканевом уровне подтверждается наличием мелких фолликулов с уплощенными тироцитами. Ядра овальной формы, цитоплазма гомогенизирована. Признаки активной резорбции коллоида отсутствуют. В рыхлой волокнистой соединительной ткани, окружающей фолликулы, слабо развита сеть капилляров. При этом со стороны парафолликулярных клеток отмечаются гиперфункциональные изменения. Несмотря на то, что средняя площадь С-клеток достоверно не изменяется, в основном, отмечаются дегранулированные формы клеток, являющиеся максимально активными в функциональном отношении [5]. С-клетки залегают одиночно, или небольшими группами, как правило они своими вершинами не достигают просвета фолликула. Форма С-клеток не изменена- полигональная или вытянутая с округлыми ядрами, расположенными в центральной части цитоплазмы. С – клетки локализованы в центральных участках железы, в прослойках соединительной ткани между фолликулами, или в стенке фолликулов и имеют типичную полигональную или вытянутую форму.

При ультраструктурном исследовании С-клеток обнаруживаются ядра правильной округлой или овальной формы с преобладанием эухроматина, гетерохроматин узким слоем конденсируется вдоль внутренней кариолеммы. Соотношение площадей эу-и гетерохроматина достоверно увеличивается на 11%, что может свидетельствовать о гиперфункциональной активности С – клеток. В ядрышках определяется четкое ячеистое строение, что соответствует их типичной ультраструктуре. Ядерно-ядрышковое соотношение достоверно не меняется (табл. 1). Перинуклеарное пространство не выражено. Наружная мембрана кариолеммы снабжена множественными рибосомами и находится в тесном контакте с мембранами гранулярной эндоплазматической сети, которая в С-клетках хорошо выражена и богата рибосомами.

Таблица 1

Ультраструктурная морфометрия ядерного аппарата С-клеток щитовидной железы

Серия	Ядрышко-ядерное соотношение в $M \pm m$	Соотношение площадей эу- и гетерохроматина, $M \pm m$
Контроль (n=5)	0,038 \pm 0,002	1,712 \pm 0,05
Гипофизэктомия (n=9)	0,036 \pm 0,002	1,912 \pm 0,01 p<0,01

Цитоплазма содержит многочисленные свободные рибосомы. Комплекс Гольджи развит хорошо и локализуется в околоядерном пространстве. Плотнупакованные цистерны, трубочки и каналцы занимают значительную часть объема клетки. В цитоплазме обнаруживаются мелкие секреторные пузырьки, отмечается явление дегрануляции. Достоверно увеличивается число

митохондрий на 19%. Они имеют овальную форму, гомогенный матрикс, кристы упакованы плотно в горизонтальном направлении. Количество крист в расчете на 1 ЭГ достоверно увеличивается почти на 19% (табл. 2). Коэффициент энергетической эффективности составляет 157,6%, что свидетельствует о гиперфункциональной активности исследуемых клеток.

Таблица 2

Количественная характеристика ультраструктурных изменений митохондриального аппарата С-клеток щитовидной железы

Серия	Количество мит в 1 ЭГ $M \pm m$	Количество крист в 1 мит $M \pm m$	Количество крист в 1 ЭГ $M \pm m$	Средняя площадь 1 мит $M \pm m$	Суммарная площадь мит в 1 ЭГ $M \pm m$
Контроль (n=5)	5,8 \pm 1,31	8,6 \pm 2,12	44,6 \pm 17,03	0,0145 \pm 0,0001	0,0605 \pm 0,0138
Гипофизэктомия (n=9)	6,9 \pm 1,06 p<0,01	10,6 \pm 1,31 p<0,01	53,1 \pm 10,05 p<0,01	0,0193 \pm 0,0002 p<0,01	0,0801 \pm 0,0115 p<0,01

Достоверно уменьшается количество электронноплотных гранул на 51%, преобладают дегранулированные формы С-клеток.

Выводы

С помощью комплекса морфометрических исследований выявлены гиперпла-

зия С-клеток и выраженное повышение функциональной активности, что, по-видимому, является компенсаторной реакцией на фоне повышения уровня кальция при гипофизэктомии, вызывающей угнетения тиреоидной гормональной функции.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Романова И.В. Щитовидная железа и гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система у *anamniota* после гипофизэктомии и воздействия нонапептидными нейрогормонами: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 1997. 18 с.
2. Титова М.А. Морфофункциональная характеристика С-клеток щитовидной железы в онтогенезе и эксперименте: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саранск, 2003. 17 с.
3. Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном

- при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. №8. С. 215-219.
4. Geng H., Zhang X., Wang C., Zhao M., Yu C., Zhang B. et al. Even mildly elevated TSH is associated with an atherogenic lipid profile in postmenopausal women with subclinical hypothyroidism // *Endocr Res*. 2014. Mar 28.
 5. Васильева Е.В. Влияние прерывистой гипербарической гипоксии на морфофункциональные изменения щитовидной железы у крыс в норме и при экспериментальной дисфункции: автореф. дис ... канд. биол. наук. Ульяновск, 2009. 19 с.
 6. Полоз А.И., Финогенов А.Ю. Методические указания по гуманной эвтаназии животных. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2008. 45 с.
 7. Чумаченко П.А., Анисимова С.А. Влияние гипофизэктомии на патоморфоз кистозной мастопатии // Актуальные вопросы клинической морфологии. Рязань, 2000. С. 67-68.
 8. Андроник В.И., Мельник Б.Е. Качественно-количественная характеристика структуры тиреоцитов (при экспериментальной гипер- и гиподисфункции). Кишинев: Штиинца, 1986. 136 с.
 9. Журавская О.Я. Морфофункциональные изменения гипоталамо-нейрогипофизарной системы неполовозрелых крыс при стрептозотоциновом диабете // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013. №1. С. 24-30.
 10. Мнихович М.В. Ультраструктурная оценка иммунного ответа в карциномах молочной железы при фиброзно-кистозной болезни // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2013. №4. С.7-14.
- ### References
1. Romanova IV. *Shchitovidnaya zheleza i gipotalamo-gipofizarnaya nejrosekretornaya sistema u anamnia posle gipofizektomii i vozdejstviya nonapeptidnymi nejrogormonami: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Thyroid gland and the hypothalamic-hypophyseal neurosecretory system in anamnia after gipofizektomii and impact nonapeptide by neurohormones: author. dis. ... cand. biol. sciences]*. St. Petersburg; 1997. 18 p.
 2. Titova MA. *Morfofunkcional'naja harakteristika S-kletok shchitovidnoj zhelezy v ontogeneze i jeksperimente: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Morphofunctional characteristic of thyroid C-cell ontogenesis and experiment: abstract. dis. ... cand. biol. sciences]*. Saransk; 2003. 17 p.
 3. Yaglova NV. Narusheniya sekretornogo cikla follikulyarnyh tirocitov i ih korrekciya tireotropnym gormonom pri ehksperimental'nom sindrome netireoidnyh zabolevanij [Violations of the secretory cycle of follicular thyrocytes and their correction of thyroid-stimulating hormone in experimental nonthyroidal illness syndrome]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2011; 8: 215-219.
 4. Geng H, Zhang X, Wang C, Zhao M, Yu C, Zhang B et al. Even mildly elevated TSH is associated with an atherogenic lipid profile in postmenopausal women with subclinical hypothyroidism // *Endocr Res*. 2014. Mar 28.
 5. Vasil'eva EV. *Vliyanie preryvistoj giperbaricheskoj gipoksii na morfofunkcional'nye izmeneniya shchitovidnoj zhelezy u krys v norme i pri ehksperimental'noj disfunkcii: avtoref. dis ... kand. biol. nauk [Effect of intermittent hyperbaric hypoxia on morphofunctional changes of the thyroid gland in rats in norm and under experimental dysfunction: author. dis ... kand. biol. sciences]*. Ulyanovsk; 2009. 19 p.
 6. Poloz AI, Finogenov AJu. *Metodicheskie ukazaniya po gumannoju jevtanazii zhivotnyh [Guidelines for humane euthanasia of animals]*. Minsk: RUE «Institute of experimental veterinary medicine named. S.N. Wirellessrage»; 2008. 45 p.

7. Chumachenko PA, Anisimova SA. Vliyanie gipofizektomii na patomorfozkoznoy mastopatii [Effect of hypophysectomy on the pathomorphism of cystic mastitis]. *Aktual'nye voprosy klinicheskoy morfologii* [Actual problems of clinical morphology]. Ryazan; 2000. p. 67-68.
8. Andronik VI, Mel'nik BE. *Kachestvenno-kolichestvennaya harakteristika struktury tireocitov (prieksperimental'nojgiper-igipofunkcii)* [Qualitative and quantitative characterization of the structure of thyrocytes (in experimental Hyper- and hypofunction)]. Kishinev: Shtiintsa; 1986. 136 p.
9. Zhuravskaya OYa. Morfofunkcional'nye izmeneniya gipotalamo-nejrogipofizarnoj sistemy nepolovozrelyh krysov pri streptozotocinovom diabete [Morphological and functional changes of the hypothalamic-neurohypophyseal system of immature rats with diabetes streptozotocine]. *Rossiyskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2013; 1: 24-30.
10. Mnihovich MV. Ul'trastrukturnaya ocenka imunnogo otveta v karcinomah molochnoj zhelezy pri fibrozno-kistoznoj bolezni [Ultrastructural evaluation of immune response to prostate carcinomas mrlochnoy with fibrocystic disease]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)* [Science of young (Eruditio Juvenium)]. 2013; 4: 7-14.

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.