

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО T<sub>3</sub> НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ С-КЛЕТОК

Царева О.А.<sup>1</sup>, Рахманкина М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, e-mail: rzamu@rzamu.ru

В эксперименте на белых половозрелых крысах-самцах изучена ультраструктура С-клеток щитовидной железы при гипопункции, индуцированной введением экзогенного T<sub>3</sub>. На тканевом уровне получено подтверждение гипопункции щитовидной железы. Проводили морфометрические исследования фолликулов. Индекс накопления статистически достоверно увеличивается более чем в 2 раза. На ультраструктурном уровне проведены морфометрические исследования ядерного аппарата и органелл цитоплазмы С-клеток. Исследовалось ядерно-ядрышковое соотношение и соотношение эу- и гетерохроматина. Для изучения энергетического компартмента С-клеток подсчитывали сумму крист в митохондриях и среднюю площадь митохондрий и на основе морфометрических данных вычисляли коэффициент энергетической эффективности. Выявлены ультраструктурные изменения, которые свидетельствуют о гиперфункциональности состояния С-клеток на фоне выраженного угнетения тиреоидной гормональной функции.

Ключевые слова: С-клетки, крысы, гипопункция, трийодтиронин.

## INFLUENCE OF EXOGENOUS T<sub>3</sub> ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF C- CELLS

Tsareva O.A., Rakhmankina M.A.

*Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, e-mail: rzamu@rzamu.ru*

The ultrastructure of thyroid gland's C-cells in hypothyroidism induced by of exogenous T<sub>3</sub> administration was studied in experiment on white mature rats. Confirmation of hypothyroidism was obtained at the tissue level. Morphometric studies of the follicles were held. The index of accumulation is significantly increased more than 2 times. 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. 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 ultrastructural changes indicating C- cells hyperfunctional condition on the background of the thyroid hormone function were discovered.

Keywords: cells, rats, hypothyroidism, triiodothyronine.

В сложной регуляции основных жизненно важных процессов в организме одно из центральных мест принадлежит эндокринной системе. Принимая во внимание тот факт, что щитовидная железа является одним из ключевых звеньев нейроэндокринной системы, исследования, посвященные изучению ее морфофизиологической характеристики, несомненно, актуальны. В частности, в области нормальной патологической морфологии щитовидной железы остается много дискуссионных и неясных вопросов, имеющих прямое отношение к решению проблемы широко распространенной тиреоидной патологии. При этом большинство авторов уделяют внимание изучению тироцитов щитовидной железы, упуская из внимания ее С-клеточный аппарат [4; 6-8]. Тесная структурная связь фолликулярных и парафолликулярных клеток остается нерасшифрованной как в морфологических деталях, так и в функциональном аспекте.

Известно, что одним из показателей функциональной активности С-

клеток является уровень и особенности их гранулярного насыщения, состояние ядерного аппарата и энергетического компартмента.

Представляется интересным изучение функциональной активности С-клеток при помощи морфометрических исследований при экспериментальной гипофункции, индуцированной введением экзогенного трийодтиронина.

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 20 половозрелых белых нелинейных крысах-самцах массой 210-230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Модель гипофункции щитовидной железы вызывали подкожным введением трийодтиронина (Т<sub>3</sub>) в разовой дозе 100 мкг/кг в течение 7 суток. Животные контрольной группы в те же сроки получали инъекции растворителя 0,025 М NaOH. Эвтаназию крыс осуществляли углекислым газом в течение 15-20 мин через 24 ч после последней инъекции препарата [3].

Для исследования на тканевом уровне изготавливали гистологические препараты. Для этого кусочки щитовидной железы размером 2x2 мм фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Для обезвоживания проводили по спиртам с возрастающей концентрацией. Обезвоживание заканчивали в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 6-7 мкм для гистологических препаратов изготавливали на санном микротоме и окрашивали их гематоксилин - эозином.

Для морфометрических исследований на тканевом уровне на полутонких срезах с помощью линейного окуляр-микрометра при увеличении 420 и 945 измеряли высоту фолликулярного эпителия и диаметр фолликула. Вычисляли среднюю площадь фолликула по формуле [1]:

$$S = \frac{d_1 \times d_2}{4} \times \pi.$$

Рассчитывали индекс накопления по формуле [1]:

$$I_n = \frac{d}{2h}.$$

Исследования на клеточном уровне проводили под электронным микроскопом ЭМ-125К. Кусочки щитовидной железы размером 1x1 мм фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида при 4 °С 4 часа. Промывку материала осуществляли в фосфатном буфере рН 7,4 трижды, в течение полутора часов. Постфиксацию проводили в 1%-ном 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 [1]. 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. Морфометрию энергетического компартмента 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 активности (КЭЭМ).

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

Ультраструктурную морфометрию электронно-плотных гранул С-клеток проводили на негативных электронограммах при увеличении 10000. По каждой серии опытов обрабатывали по 10 электронограмм (ЭГ).

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики. Вычисления проводились на компьютере с использованием прикладных программ Statistic, Sigma Plot. Вероятность  $p < 0,05$  считали достаточной для вывода о достоверности различий между вариационными рядами.

### **Результаты и их обсуждение**

При исследовании гистологических препаратов выявлено гипофункциональное состояние щитовидной железы. Фолликулы мелкие, признаки резорбции коллоида отсутствуют, тироциты упрощены. Ядра темные, овальной формы с изрезанными краями. Капилляры гемоциркуляторного русла развиты слабо. Средняя площадь фолликула уменьшается на 21%. Высота тироцитов снижается на 30%. Индекс накопления статистически достоверно увеличивается более чем в 2 раза (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика функциональной активности фолликулов щитовидной железы при экспериментальной гипофункции, вызванной введением экзогенного  $T_3$

Серия	Средняя площадь фолликула, мкм <sup>2</sup> M±m	Высота эпителия фолликула, мкм M±m	Индекс накопления M±m
Контроль (n=10)	1701,2±15,498	1,3±2,058	1,76±0,068
T <sub>3</sub> (n=10)	1219,1±12,341	0,91±1,569 p<0,05	3,61±0,051 p<0,01

При морфометрических исследованиях на тканевом уровне С-клеток выявлено незначительное увеличение их средней площади. Оптическая плотность цитоплазмы не отличается от контроля. В литературе имеются данные о четырех типах парафолликулярных клеток, находящихся на различных стадиях секреторного цикла [2]:

- отсутствие дегрануляции (цитоплазма целиком заполнена аргирофильными гранулами), что отражает гипофункциональное 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 эндокриновая, так и паракриновая секреция.

Как и в норме, С–клетки локализованы в центральных участках железы, в прослойках соединительной ткани между фолликулами или в стенке фолликулов и имеют типичную полигональную или вытянутую форму, содержат крупные ядра округлой формы. В наших исследованиях С–клетки с цитоплазмой, богатой аргирофильными гранулами, практически не выявлены. При этом 14% приходится на кальцитониноциты, у которых гранулы выявляются в области тироцитарного полюса клетки, 16% составляют кальцитониноциты, у которых основная масса секреторных гранул сконцентрирована на сосудистом полюсе С-клетки. Среди популяций С-клеток преобладают дегранулированные формы, на которые приходится 70%. Таким образом, в щитовидной железе на фоне введения экзогенного T<sub>3</sub> преобладают кальцитониноциты, максимально активные в функциональном отношении. Гиперплазия С-клеток вызвана, по-видимому, механизмом обратной связи на фоне введения экзогенного T<sub>3</sub>. Это вполне согласуется с литературными данными, согласно которым курс

инъекций трийодтиронина сопровождается ростом уровня кальция на фоне выраженного угнетения тиреоидной гормональной функции [5].

При ультраструктурном исследовании ядерного аппарата С-клеток обнаруживаются ядра правильной округлой или овальной формы с преобладанием эухроматина, гетерохроматин в форме небольших глыбок узким слоем конденсируется вдоль внутренней кариолеммы. О гиперфункциональной активности С-клеток может свидетельствовать соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина, которое достоверно увеличивается на 10% по сравнению с контролем. В ядрышках определяется четкое ячеистое строение, что соответствует их типичной ультраструктуре. По данным морфометрии, ядерно-ядрышковое соотношение достоверно увеличивается на 18% (табл. 2). Перинуклеарное пространство не выражено. Наружная мембрана кариолеммы снабжена множественными рибосомами и находится в тесном контакте с мембранами гранулярной эндоплазматической сети.

Таблица 2

Ультраструктурная морфометрия ядерного аппарата С-клеток щитовидной железы при экспериментальной гипофункции, вызванной введением экзогенного Т<sub>3</sub>

Серия	Ядрышко-ядерное соотношение, М±m	Соотношение площадей эухроматина и гетерохроматина, М±m
Контроль (n=5)	0,038±0,002	1,712±0,05
Т <sub>3</sub> (n=15)	0,045±0,002 p<0,01	1,883±0,01 p<0,01

Гранулярная эндоплазматическая сеть в С-клетках хорошо выражена и содержит на мембранах большое число рибосом. Плотнупакованные цистерны, трубочки и каналцы комплекса Гольджи занимают значительную часть объема клетки. Большинство С-клеток, по данным морфометрии (77%), с признаками дегранулирования, что свидетельствует об одновременно происходящей эндокриновой и паракриновой секреции. В 12% С-клеток отмечается незначительное число гранул в области тироцитарного полюса клетки, что служит признаком экспрессии гормонов в кровь, то есть эндокринной секреции. В 11% С-клеток отмечается незначительное число гранул на сосудистом полюсе С-клетки, что говорит о выделении биологически активных веществ в тироцитарном направлении и характерно для паракринового вида секреции.

При проведении морфометрических исследований энергетического компартмента С-

клеток. Установлено достоверное увеличение числа митохондрий на 22%. Они имеют овальную форму, гомогенный матрикс, кристы упакованы плотно в горизонтальном направлении. Количество крист достоверно увеличивается почти на 30% (табл. 3). Коэффициент энергетической активности составляет 157,6%, что свидетельствует о гиперфункциональной активности исследуемых клеток.

Таблица 3

Количественная характеристика ультраструктурных изменений митохондриального аппарата С-клеток щитовидной железы при экспериментальной гипопункции, вызванной введением экзогенного Т<sub>3</sub>

Серия	Количество мит. в 1 ЭГ, М±m	Количество крист в 1 мит., М±m	Количество крист в 1 ЭГ, М±m	Средняя площадь 1 мит., М±m	Суммарная площадь мит. в 1 ЭГ, М±m
Контроль (n=5)	5,8±1,31	8,6±2,12	44,6±17,03	0,0145±0,0001	0,0605±0,0138
Т <sub>3</sub> (n=15)	7,1±1,06 p<0,01	9,9±1,31 p<0,01	51,1±10,05 p<0,01	0,0189±0,0002 p<0,01	0,0799±0,0115 p<0,01

### Выводы

С помощью комплекса морфометрических исследований выявлены гиперплазия С-клеток и выраженное повышение функциональной активности, что, по-видимому, является компенсаторной реакцией на фоне повышения уровня кальция на фоне введения экзогенного трийодтиронина, вызывающего угнетения тиреоидной гормональной функции.

### Список литературы

1. Андроник В.И. Качественно-количественная характеристика структуры тиреоцитов (при экспериментальной гипер- и гипопункции) / В.И. Андроник, Б.Е. Мельник. – Кишинев : Штиинца, 1986. - 136 с.
2. 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.
3. Полоз А.И., Финогенов А.Ю. Методические указания по гуманной эвтаназии животных. — Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2008. - 45 с.

4. Романова И.В. Щитовидная железа и гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система у ANAMNIA после гипофизэктомии и воздействия нонапептидными нейрогормонами : автореф. дис. ... канд. биол. наук (03.00.11) / Ин-т эволюц. физиологии и биохимии С.-Петербурга. – СПб., 1997. – 18 с.
5. Строев Е.А., Булаева Н.Н. Кальциевый ответ тиреоцитов при изменениях функционального состояния щитовидной железы / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1998. - № 1. - С. 101-103.
6. Титова М.А. Морфофункциональная характеристика С-клеток щитовидной железы в онтогенезе и эксперименте : автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Саранск, 2003. - 17 с.
7. Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2011. - № 8. - С. 215-219.
8. Geng H. Even mildly elevated TSH is associated with an atherogenic lipid profile in postmenopausal women with subclinical hypothyroidism / H. Geng, X. Zhang, C. Wang, M. Zhao, C. Yu, B. Zhang, Y. Wang, B. Ban, J. Zhao // Endocr Res. – 2014. - Mar 28. - P/302-304.