

Ультраструктурные изменения ациноцитов поджелудочной железы крыс в динамике развития врожденного гипотиреоза

О.В. Остапенко, Ю.Б. Чайковский

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Контактная информация: Остапенко Ольга Валериевна, stepashca@mail.ru

С помощью гистологического и электронно-микроскопического анализа изучено морфофункциональное состояние секреторных клеток поджелудочной железы при врожденном гипотиреозе. В эксперименте показано развитие дистрофических изменений у животных в возрасте 7 суток и компенсаторно-приспособительных у животных в возрасте 45 суток.

Ключевые слова: врожденный гипотиреоз, ультраструктура, поджелудочная железа.

Введение

На сегодняшний день актуальным является изучение проблемы недостатка гормонов щитовидной железы. Тироидные гормоны, обладая широким спектром биологического действия, транслируют свой биохимический, физиологический и патологический эффект на важнейшие метаболические звенья организма, контролируя ряд сложных биохимических превращений белкового, углеводного, липидного и водно-солевого обмена. А также влияют на активность и организацию аппарата синтеза белка в клетке, интенсивность транспорта электролитов, ионов, субстратов, тем самым повышая эффективность биоэнергетических реакций. При гипотиреозе поражаются многие органы и системы организма, в том числе и органы пищеварительной системы [1-3, 5]. Изучение процессов, происходящих в поджелудочной железе при гипотиреозе, является важным направлением в медицине и биологии.

Цель настоящего исследования состояла в изучении особенностей строения экзокринной части поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом на разных сроках постнатального периода.

Материалы и методы

Опыт был проведен на 56 беспородных белых крысах-самцах массой 9,5-11,1 г (7 суток), 119,5-128,1 г (45 суток). Животные были разделены на четыре группы: 1 и 2 – интактные животные в возрасте 7 и 45 суток; 3 группа состояла из животных с врожденным гипотиреозом в возрасте 7 суток; и 4 группа – животные с врожденным гипотиреозом в возрасте 45 суток.

Беременным самкам *per os* вводили препарат мерказолил, для подавления функций щитовидной железы самок, таким образом, моделировали потомству врожденный гипотиреоз. Препарат вводили в течение всего эксперимента ежедневно в дозе 20 мг/кг массы тела, растворенным в воде. Новорожденные

крысята получали препарат с молоком матери. На 7 и 45 сутки после рождения контрольных и экспериментальных животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом [4].

Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), а также согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных. Содержание лабораторных животных отвечало «Общепринятым этическим принципам экспериментов над животными», утвержденным 20.09.2001 Первым Украинским национальным конгрессом по биоэтике.

Для электронно-микроскопического исследования фрагменты поджелудочной железы размером 1 мм³ фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) с дофиксацией в 1% растворе OsO₄, затем проводили дегидратацию в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Заливали в эпон-аралдитовые блоки согласно общепринятой методике. С помощью ультрамикротомы LKB III изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы окрашивали двухцветной окраской по Nayat [6]. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Ультраструктурные изменения в клетках поджелудочной железы изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-125К.

Кроме того, методом иммуноферментного анализа в крови определяли содержание свободного тироксина в плазме с помощью прибора «Sunrise RC» фирмы ТЕКАН (Швейцария).

При статистической обработке полученных результатов определяли средние значения параметров и ошибки средних. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью t критерия Стьюдента. За уровень достоверности статистических показателей принято $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В постнатальном периоде поджелудочная железа крыс контрольной группы представлена плоским, диффузным органом с непостоянными очертаниями, состоящим из отдельных маленьких гроздевидных долек, связанных рыхлой соединительной тканью в одно древоподобное разветвляющееся образование.

Постепенно происходит созревание и дифференцировка органа, изменяется функциональная активность органа и ферментный состав секреторного материала. У молодых животных многие группы ферментов не столь активны как у взрослых, с возрастом увеличивается активность протеаз, липаз и ферментов, расщепляющих углеводы. Изменяется процентное соотношение клеток с гранулами и без (приближается к показателям 50:50), а также количество клеток, содержащих липидные включения (табл.).

Гистологическое исследование полутонких срезов поджелудочной железы под световым микроскопом показало, что в период молочного кормления (7 сутки) клеточный состав паренхимы органа характеризуется морфологиче-

ским разнообразием. Четко визуализируются темные и светлые клетки, одноядерные и двоядерные ациноциты. Аналогичные клетки отмечаются в паренхиме поджелудочной железы у животных в возрасте 45 суток. Следует отметить, что у 7-ми-суточных животных встречаются малодифференцированные клетки небольших размеров со слабо развитыми органеллами.

Врожденный гипотиреоз 7 суток

Методом иммуноферментного анализа было установлено снижение уровня свободного тироксина в два раза. При врожденном гипотиреозе отмечается отставание в развитии – уменьшение массы тела животных, на 11,64% по сравнению с контрольной группой. Ряд авторов отмечают отставание в развитии животных (уменьшение массы тела, уменьшение массы органов) на ранних этапах врожденного гипотиреоза. В развитии и созревании организма и органов гормоны щитовидной железы играют главенствующую роль именно на ранних этапах (в юном возрасте), по сравнению с взрослым организмом (в зрелом возрасте). Происходит наложение возрастных изменений органа и изменений, связанных с врожденным гипотиреозом.

Патологическое состояние отмечается на всех уровнях организации, в том числе и на клеточном уровне. С помощью методов световой микроскопии было установлено, что увеличено количество клеток со светлой цитоплазмой. Это обусловлено как снижением функциональной активности, так и патологическими изменениями, происходящими в органе на фоне врожденного гипотиреоза.

Светлые клетки характеризуются изменением структурной организации секреторного аппарата. Цистерны гранулярной эндоплазматической сети частично теряют параллельный ход и укорачиваются, превращаясь в укороченные мешочки и вакуоли (рис. 1). В результате ход цистерн становится хаотичным и неупорядоченным. Цитоплазма заполняется пузырьками и вакуолями, размеры которых сильно варьируют. Следует отметить, что на мембранах гранулярной эндоплазматической сети уменьшается количество рибосом. Увеличение агранулярной эндоплазматической сети сопровождается нарушением синтетических процессов веществ белковой и липидной природы. В базальной части ациноцитов наблюдаются липидные включения. Цистерны комплекса Гольджи расширяются и образуют вакуоли. Недостаток гормонов щитовидной железы так же негативно сказывается и на энергетическом аппарате клетки. Количество митохондрий резко снижается, по сравнению с контролем. Органеллы приобретают округлую форму, матрикс митохондрий просветлен. Внутренняя, а некоторых случаях и наружная, мембрана становится прерывистой, теряет свою целостность. Однако в цитоплазме встречаются более мелкие митохондрии, с электронно плотным матриксом и слабо различимыми кристами.

В апикальной части ациноцитов отмечается скопление большого количества секреторных гранул, размеры и электронная плотность которых также варьирует. Зимогенные гранулы содержат секрет разной степени зрелости (гранулы зимогена и прозимогена), что связано с разной степенью созревания продукта секреции и функциональной

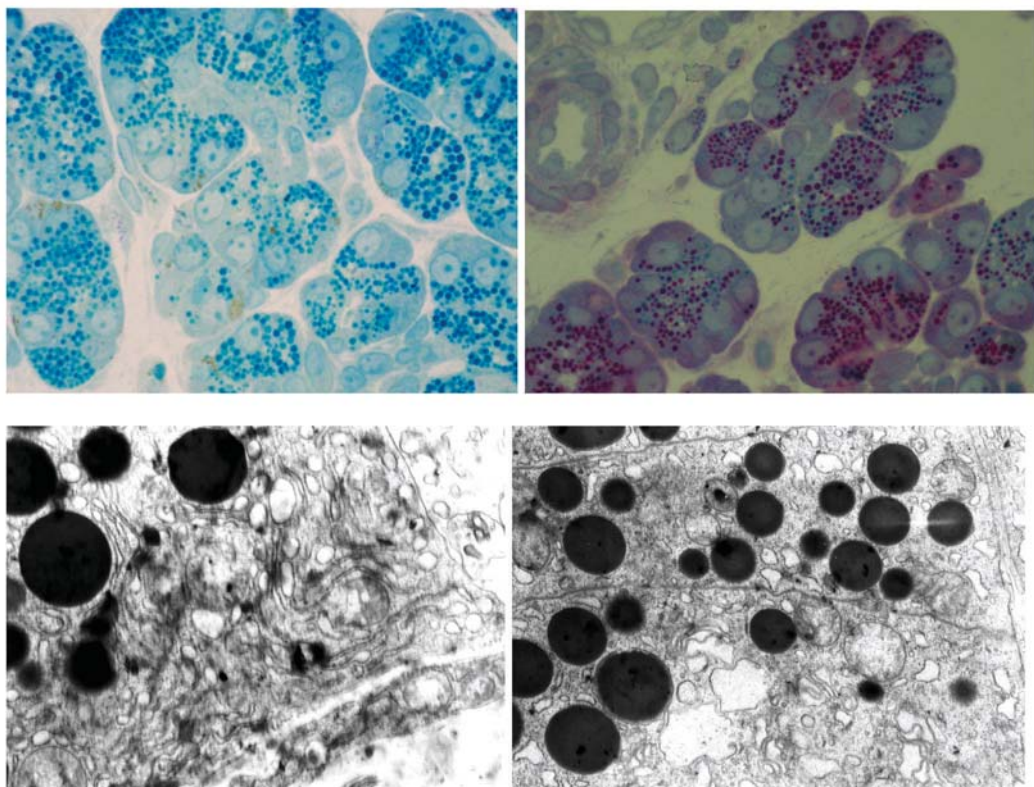


Рис.1. Фрагменты поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом в возрасте 7 суток. Скопление большого количества секреторного материала в ациноцитах. Скопление липидных включений в базальной части клеток. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым синим, по Наят. Ув. $\times 1200$ (А, Б). Ультраструктурные изменения ациноцитов. Дезорганизация цистерн эндоплазматической сети, комплекса Гольджи (В). Нарушение целостности мембран митохондрий (Г). Ув. $\times 9600$ (В), $\times 8000$ (Г).

дисфункции. Скопление секреторного материала в апикальной и средней части клетки сопровождается нарушением процесса его выделения в просвет ацинуса. У животных в возрасте 7 суток с ВГТ резко снижается количество клеток, содержащих зимогенные гранулы, а также количество клеток в состоянии экстружии (табл.).

В темных ациноцитах описанных выше изменений не наблюдается. Темные клетки характеризуются относительной целостностью органелл. Возможно, это связано с тем, что клетки,

находясь на разных стадиях жизненного цикла и секреторного цикла, в разной степени реагируют на недостаток тиреоидных гормонов.

Врожденный гипотиреоз 45 суток

У животных в возрасте 45 суток отмечается снижение уровня свободного тироксина и увеличение массы тела на 4,36%, по сравнению с контролем. С возрастом секреторный процесс изменяется, урегулируется. Количество клеток, содержащих секреторные гранулы, уменьшается и, соответственно,

Таблица

Описательная статистика секреторных клеток поджелудочной железы крыс в контроле и при врожденном гипотиреозе

Параметры	Возраст животных			
	7 суток		45 суток	
	Контроль	ВГТ	Контроль	ВГТ
Ациноциты с гранулами	$7,76 \pm 0,43$ 86,22%	$8,66 \pm 0,35$ 98,97%	$4,19 \pm 0,14$ 56,55%	$7,41 \pm 0,38^*$ 92,39%
Ациноциты без гранул	$1,24 \pm 0,26$ 13,78%	$0,09 \pm 0,05^{*,**}$ 1,03%	$3,22 \pm 0,17$ 43,45%	$0,61 \pm 0,15^{*,**}$ 7,61%
Ациноциты, выделяющие секрет	$3,03 \pm 0,44$ 33,67%	$0,79 \pm 0,15^{*,**}$ 9,03%	$2,84 \pm 0,17$ 38,33%	$6,94 \pm 0,39^{*,**}$ 86,53%
Клетки с липидами	$0,62 \pm 0,19$	$1,79 \pm 0,22^{*,**}$	$0,16 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,14^{*,**}$
	58	58	58	66

Примечание: Данные в таблице представлены в виде $M \pm m$ для всех групп животных:

* – достоверные отличия от группы контроля К ($p < 0,05$);

** – достоверные отличия от первой группы ($p < 0,05$).

увеличивается количество клеток без секреторных гранул. Однако процент клеток, выделяющих секрет, значительно не отличается (33,67% и 38,33%). Врожденный гипотиреоз более длительного периода (45 суток) приводит к ускорению процесса экстрюзии, наблюдается резкое увеличение количества клеток, содержащих и выделяющих секрет, по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста (таб.).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что на более поздних сроках эксперимента разнообразие клеточного состава сохраняется, но в меньшей степени (по сравнению с предыдущим сроком). Четкого разделения на темные и светлые клетки на полутонких срезах не наблюдается (рис. 2).

Большая часть клеток характеризуется незначительным расширением цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Параллельный ход цистерн сохраняется. В отдельных участках цитоплазмы на месте мембран-

ных органелл образуются миелиноподобные тельца.

В цитоплазме встречаются митохондрии двух типов. Часть митохондрии округлой формы, просветленным матриксом и слабо развитыми кристами. Встречаются органеллы с признаками нарушения целостности мембран. Второй тип – митохондрии удлинённой палочковидной формы, электронно-плотным матриксом и слабо различимыми кристами.

В апикальной части клеток скопление секреторных гранул с зимогеном и прозимогеном. Количество секреторных гранул снижено по сравнению с предыдущим сроком наблюдений. Нарушения процессов секреции не наблюдается.

Поджелудочная железа крысы и человека существенно отличается внешним видом (формой, размерами, расположением), однако имеет принципиально схожую внутреннюю структуру. Поэтому установленные изменения в ациноцитах поджелудочной железы

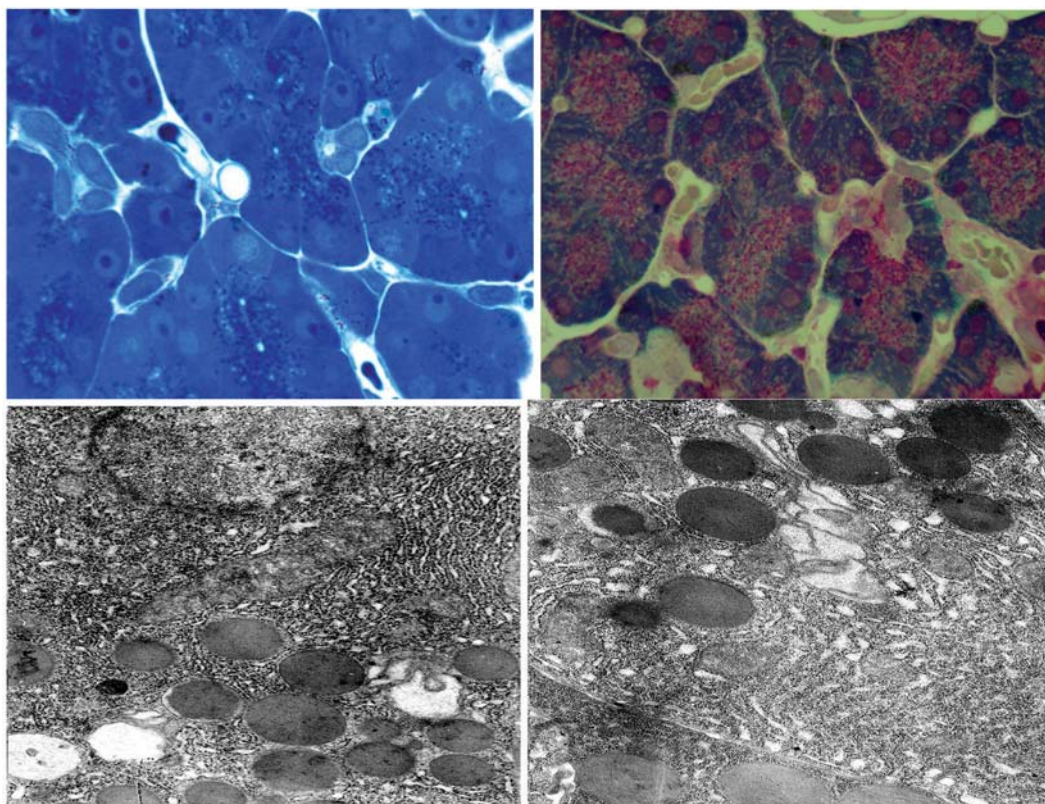


Рис. 2. Фрагменты поджелудочной железы крыс с врожденным гипотиреозом в возрасте 45 суток. Зональность ациноцитов. Скопление зимогенных гранул в апикальной части ациноцитах. Отсутствие липидных включений в базальной части клеток. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым синим, по Hayat. Ув. $\times 1200$ (А, Б). Ультраструктурные изменения ациноцитов. Расширение цистерн эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Удлиненные митохондрии с электрон плотным матриксом. Образование миелоноподобных тел. Ув. $\times 9600$ (В, Г).

при врожденном гипотиреозе могут учитываться при дальнейшем изучении механизмов нарушения экзокринной функции этого органа у людей разных возрастных групп.

Выводы

При развитии врожденного гипотиреоза на ранних этапах отмечается отставание в развитии. Про задержку процессов дифференцировки в экзокринной части поджелудочной железы свидетельствует недостаточное форми-

рование синтетического аппарата, что оказывает влияние на процессы синтеза и секреции ферментов.

Выявленные изменения структурной организации экзокринной части поджелудочной железы в ранние сроки врожденного гипотиреоза (7 суток) носят реактивный характер и свидетельствуют о дезорганизации секреторного эпителия поджелудочной железы, а на более поздних сроках (45 суток) преобладают компенсаторные процессы над деструктивно-дистрофическими.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости ранней диагностики врожденного гипотиреоза и обязательной терапевтической коррекции данных изменений.

Список литературы

1. *Кузьменко Ю.Ю., Божко О.Г.* Особливості структурних змін нефрону в динаміці розвитку вродженого гіпотиреозу // Вісник проблем біології та медицини. 2013. Вип.1. Т.1(98). С. 125-128.
2. *Остапенко О.В.* Морфофункциональное состояние печени крыс при коррекции гипотиреоза L-тироксинном в комплексе с кальцитонином // Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013. № 1. С.19-21.
3. *Чухрай С.М.* Ультраструктура кровоносних капілярів міокарда статевозрілих щурів із вродженим гіпотиреозом // Світ медицини та біології. 2010. № 4. С.164-168.
4. Эвтаназия экспериментальных животных (методические рекомендации по выведению животных из эксперимента). М: Наука. 1985. 32 с.
5. *Athea Y., Garnier A., Fortin D., et al.* Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure // Pflugers Arch 2007. Vol. 455(3). P. 431-442.
6. *Hayat M.A.* Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications // Macmillan Press. 1989. P. 470.

Ultrastructural changes of rats pancreas acynocytes in the dynamics of congenital hypothyroidism development

O.V. Ostapenko, Yu.B. Chaikovsky

By means of histological and electron microscopic analysis is studied the morphofunctional state of the secretory pancreas cells in congenital hypothyroidism. The experiment shows the development of dystrophic changes of in the animals at the age of 7 days and compensatory adaptive animals at the age of 45 days.

Key words: congenital hypothyroidism, ultrastructure, pancreas.