

© В.В.Кулаева, В.Л.Быков, 2016
УДК 611.44

В.В.Кулаева, В.Л.Быков

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ И ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕПТИДНОГО МОРФОГЕНА ГИДРЫ

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. В.Л.Быков), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова

Изучено влияние пептидного морфогена гидры (ПМГ) на морфометрические и количественные гистохимические показатели щитовидной железы (ЩЖ). Опыты поставлены на 40 нелинейных белых мышах-самцах массой 20–25 г, которым в течение 5 сут внутрибрюшинно вводили ПМГ из расчета 100 мкг/кг массы тела в сутки. На поперечных срезах ЩЖ проводили стереологическую оценку относительных объемов, занимаемых в органе эпителием (Е), в том числе фолликулярным (Е_ф), интерфолликулярным (Е_и) компонентами и коллоидом (С). Определяли соотношения Е/Е_ф и Е/С — показатели фолликулярной организации и активности ЩЖ соответственно. Оценивали также митотическую активность тироцитов. На криостатных срезах материала, замороженного в жидком азоте, выявляли ферменты, характеризующие метаболическую активность тироцитов: NADH-диафорузу, сукцинат- и лактатдегидрогеназу и проводили цитофотометрическую оценку их активности. Результаты исследования показали, что введение ПМГ приводит к значительному увеличению относительного объема тиреоидного эпителия при одновременном снижении объема коллоида. Соотношение Е/Е_ф при этом значимо не отличалось от такового в контроле. ПМГ вызывает также значительное усиление пролиферации тироцитов и увеличение активности изученных ферментов. В совокупности полученные морфометрические и количественные гистоэнзимологические данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии ПМГ на функциональную активность ЩЖ и пролиферацию тироцитов.

Ключевые слова: щитовидная железа, тироциты, морфометрия, гистохимия, пептидный морфоген гидры

Биологически активный ундекапептид природного происхождения — пептидный морфоген гидры (ПМГ) — является одним из интенсивно изучаемых эндогенных регуляторных олигопептидов, влияющих на жизненно важные процессы в организме человека и животных [1, 9–11, 23, 26]. ПМГ первоначально был выделен из организма пресноводного кишечнораотового животного — гидры (*Hydra attenuata*) [27–29], в дальнейшем он был обнаружен в тканях представителей беспозвоночных, позвоночных животных [2, 7, 24, 29] и человека [5, 18]. Синтез ПМГ и ряда его структурных аналогов и фрагментов был проведен в 1992 г. [16]. Методами биологического тестирования и биохимического анализа установлено влияние ПМГ на процессы роста, активность нервной, репродуктивной и эндокринной систем [5, 7, 29]. Целью проведенных экспериментальных морфологических исследований действия ПМГ на ткани явилось преимущественно изучение его влияния на пролиферацию клеток. Показано стимулирующее воздействие ПМГ на процессы синтеза ДНК и деление клеток в различных тканях млекопитающих: эпителиях языка, трахеи, роговицы и мышечных тканях [9, 11, 20]. Между тем, воздействие ПМГ на структурные и метаболиче-

ские изменения тканей остается мало изученным. В частности, отсутствуют данные о влиянии ПМГ на морфофункциональные свойства тиреоидного эпителия и щитовидную железу в целом. В этой связи целью данного исследования явилось изучение морфофункциональных изменений щитовидной железы при введении ПМГ.

Материал и методы. Опыты проведены на 40 нелинейных взрослых белых мышах-самцах массой 20–25 г. Животным экспериментальной группы (n=28) вводили ПМГ внутрибрюшинно 5-кратно с интервалом 24 ч из расчета 100 мкг/кг массы тела. Выбор дозы ПМГ обоснован ранее проведенными исследованиями, указавшими на ее митогенный эффект [20]. Животным основной контрольной группы (n=7) с той же кратностью инъецировали эквивалентное количество растворителя — стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Для сравнения была 2-я контрольная группа, которую составили 5 интактных мышей. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 24 ч после заключительной инъекции ПМГ. Содержание животных, проведение и выведение их из эксперимента осуществляли с соблюдением правил, утвержденных этическим комитетом СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова [17].

Щитовидную железу фиксировали в течение 24 ч в жидкости Карнуа, обычным способом обезживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в парафин. На поперечных срезах, окрашенных гематоксилином — эозином, проводили морфометрические исследования, включающие стерео-

Сведения об авторах:

Кулаева В.В. Валерьевна (e-mail: Weta65@list.ru), Быков Владимир Лазаревич (e-mail: vbykov@spmu.rssi.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

логическую оценку относительных объемов, занимаемых в щитовидной железе эпителием (Е), включая фолликулярный (E_f) и интерфолликулярный (E_i) компоненты, коллоидом (С) и стромой (S). Измерения выполняли с помощью стереологического метода точечного счета, используя тест-сетку окулярного микрометра с 25 точками; в ходе исследования учитывали данные, полученные при регистрации 1000 точек. Измерения проводили в обеих долях железы в области промежуточной зоны, исключая наиболее периферические отделы, максимально подверженные сжатию при фиксации. На основании полученных данных, определяли соотношение E/C , которое служило показателем активности щитовидной железы, а также соотношение E_f/E_i , которое использовали как показатель степени ее фолликулярной организации [3, 4]. Подсчитывали митотически делящиеся тироциты в фолликулярном эпителии, просматривая у каждой мыши, в среднем, не менее 3000 клеток на 5 срезах. Долю делящихся клеток в популяции тироцитов — митотический индекс (МИ) выражали в промилле.

На криостатных срезах замороженного нефиксированного материала толщиной 10 мкм проводили гистоэнзимологическое исследование: при использовании тетразолиевого метода осуществляли выявление ферментов — регуляторов энергетического обмена: NADH-диафоразы (NADH-д), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [12, 13]. Количественную оценку активности ферментов осуществляли в цитоплазме тироцитов на спектроцитометре (оригинальной конструкции, собранной на основе насадки ФМЭЛ (ЛОМО, СССР) плаг-методом при об. 40, ок. 7, площади зонда 0,785 мкм² и длине волны 545 нм [6]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программного пакета Statistica for Windows v 6.0. Значимость различий средних величин показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Щитовидная железа животных обеих контрольных групп имеет типичное фолликулярное строение, причем более крупные фолликулы вариabельной формы располагаются в периферической и промежуточной зонах долей, тогда как мелкие округлые фолликулы сосредоточены, преимущественно, в цен-

тральной зоне (зональная гетероморфия). Высота тироцитов варьирует как между отдельными фолликулами (интерфолликулярная гетероморфия), так и в пределах одного фолликула (интрафолликулярная гетероморфия). По данным стереологического анализа, у животных контрольной группы средние относительные объемы (волюметрические фракции), занимаемые в железе фолликулярным и интерфолликулярным эпителием, а также коллоидом, составляют $25,9 \pm 1,1$, $13,5 \pm 1,0$ и $32,0 \pm 1,1\%$ соответственно.

У животных, получавших ПМГ, общий план строения органа не менялся, в частности визуально не были обнаружены отличия характера фолликулярной организации, формы и размеров фолликулов, их распределения по зонам доли. Сохранялась также гетероморфия органа. По данным морфометрического анализа, введение ПМГ вызывало статистически значимое почти 2-кратное увеличение относительного объема тироидного эпителия и его компонентов (E_f и E_i) по сравнению с контрольным уровнем. Воздействие ПМГ приводило также к статистически значимому снижению относительного объема коллоида — в 1,4 раза (рис. 1).

Соотношение E_f/E_i значимо не отличалось от такового в контроле, поскольку изменения этих компонентов имели однонаправленный и пропорциональный характер. Между тем, соотношение E/C увеличивалось с 1,2 в контроле до 2,9 в подопытной группе (в 2,7 раза; $P < 0,05$) (рис. 2).

После воздействия ПМГ наблюдалось нарастание митотической активности в 1,2 раза по сравнению с контролем (рис. 3). При проведении гистохимических реакций выявления NADH-д, СДГ, ЛДГ у животных контрольной и экспериментальной групп окрашенные продукты реакций (диформазаны) в виде мелкозернистого пылевид-

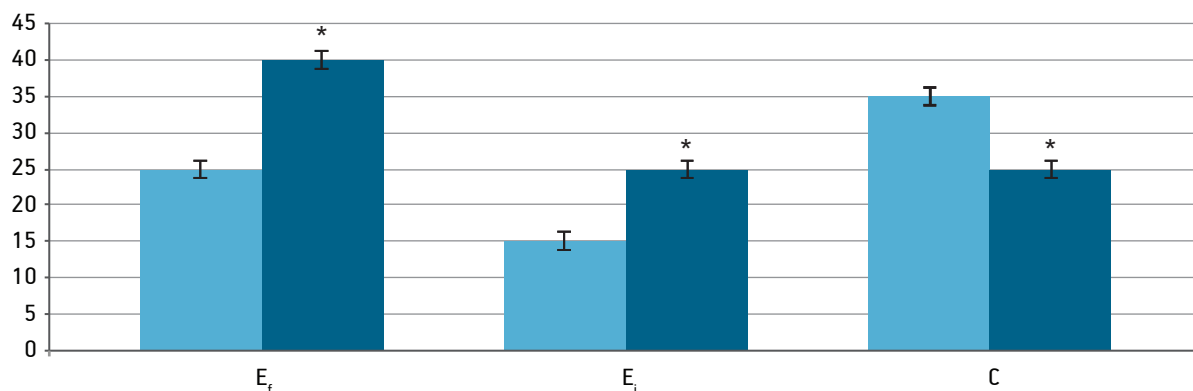


Рис. 1. Относительный объем, занимаемый в щитовидной железе фолликулярным (E_f), интерфолликулярным (E_i) эпителием и коллоидом (С) в контрольной группе мышей (светлые столбики) и после воздействия пептидным морфогеном гидры (темные столбики).

По оси ординат — величина исследованного показателя (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$

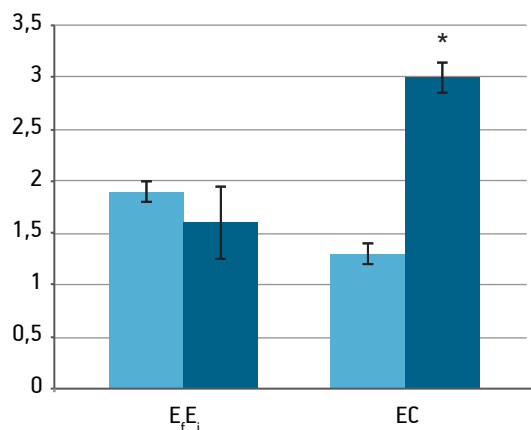


Рис. 2. Показатели степени фолликулярной организации (E_f/E_i) и функциональной активности (E/C) щитовидной железы в контрольной группе мышей (светлые столбики) и после воздействия пептидного морфогена гидры (темные столбики).

По оси ординат — величина исследованного показателя. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Звездочка — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.

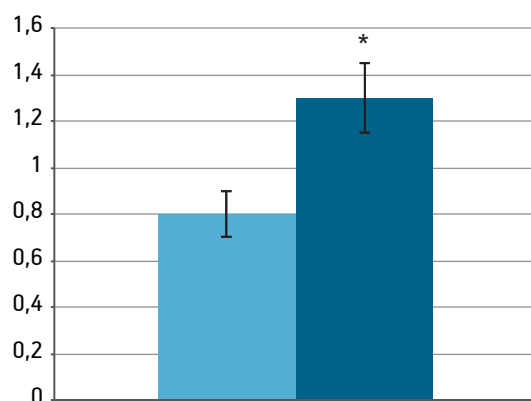


Рис. 3. Митотическая активность тироцитов в контрольной группе мышей (светлый столбик) и в экспериментальной группе (темный столбик).

По оси ординат — митотический индекс (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Звездочка — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.

ного осадка равномерно распределены в цитоплазме тироцитов в E_f и E_i .

Ядра клеток не содержали продукта реакции. Характер распределения продуктов реакций в тироцитах не менялся под влиянием ПМГ, однако уже визуально отмечалось некоторое нарастание активности изученных ферментов. При количественной цитофотометрической оценке выявлено статистически значимое увеличение интенсивности гистохимических реакций: средняя активность NADH-д в тироцитах увеличивалась в 1,7 раза, СДГ — в 1,3 раза, ЛДГ — в 1,5 раза по сравнению со значениями в контроле (рис. 4).

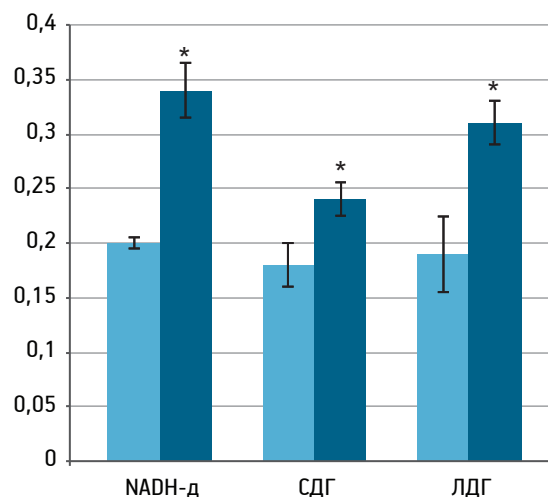


Рис. 4. Активность ферментов в тироцитах в контрольной группе (светлые столбики) и после воздействия пептидным морфогеном гидры (темные столбики).

По горизонтальной оси — исследованные ферменты: NADH-д — NADH-диафороза; СДГ — сукцинатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; по оси ординат — оптическая плотность (отн. ед.). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.

Обсуждение полученных данных. Щитовидная железа у мышей контрольной группы имеет типичное фолликулярное строение и характеризуется свойственной этому органу гетероморфией, которая проявляется на зональном, интерфолликулярном и интрафолликулярном уровнях. Морфометрические показатели, характеризующие относительные объемы (волюметрические фракции), занимаемые в железе ее структурными компонентами (E , E_f , E_i , C), а также соотношения E/C и E_f/E_i находятся в пределах величин, ранее описанных в литературе [3, 4, 21].

Введение ПМГ в течение 5 сут, в целом, не вызывает значительных изменений строения щитовидной железы у мышей, в частности, характера ее фолликулярной организации и зональности долей, а также выраженности гетероморфии. Между тем, при воздействии ПМГ морфометрический анализ показал 2-кратное увеличение относительного объема (волюметрической фракции) тиреоидного эпителия при одновременном снижении относительного объема коллоида в 1,4 раза. Выявленные изменения указывают на усиление процессов резорбции тиреоидного коллоида, т. е. на повышение функциональной активности щитовидной железы в целом, поскольку активация резорбции коррелирует с повышенной секрецией тиреоидных гормонов [4, 19, 21]. Соотношение волюметрических фракций тиреоидного эпителия и коллоида, которое считается показателем активности щитовидной железы [3, 4], после введения

ПМГ увеличивается в 2,7 раза. Между тем, соотношение волнометрических фракций эпителия (E_f и E_r), которое служит показателем степени организации эпителия в фолликулы, после введения ПМГ значимо не отличалось от такового в контроле, что свидетельствует об отсутствии влияния ПМГ (по крайней мере, при исследованном режиме введения и дозировке) на общий план строения, т. е. архитектонику железы.

В проведенном исследовании выявлена статистически значимая митогенная реакция (увеличение МИ в 1,6 раза), которая сочеталась с активацией тиреоидного эпителия под влиянием ПМГ. Результаты определения уровня митотической активности в эпителии щитовидной железы лежат в пределах величин, приведенных в работах других авторов [15, 25]. Данные об активности ферментов и их локализации в щитовидной железе, полученные в настоящем исследовании, согласуются с описаниями соответствующих гистоэнзимологических реакций в этом органе [3, 8].

Выявленный в ходе морфометрического исследования эффект повышения активности щитовидной железы согласуется с результатами проведенного цитофотометрического анализа: введение ПМГ стимулирует метаболические процессы в тиреоидном эпителии, на что указывает нарастание активности ферментов: максимально выраженное для NADH-д, умеренно — для ЛДГ и минимально — для СДГ. Как показывают данные, полученные на различных экспериментальных моделях, изменения метаболизма тироцитов отражают (возможно и определяют) сдвиги их функциональной активности [3, 8, 21, 22].

Таким образом, морфометрические и гистохимические данные свидетельствуют об активации тиреоидного эпителия и щитовидной железы в целом при воздействии ПМГ. Эти выводы согласуются со сведениями об усиленной секреции тиреоидных гормонов у животных, получавших ПМГ [14]. Морфофункциональных исследований влияния ПМГ на тиреоидный эпителий или щитовидную железу, как орган, ранее не проводили. Механизм воздействия ПМГ на тироциты остается неизученным. Описанное действие ПМГ может объясняться как его прямым влиянием на эти клетки, так и эффектом, опосредованным гипофизом [14].

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что ПМГ оказывает влияние на щитовидную железу, активируя процессы клеточного деления, дифференцировку ее эпителия и метаболические сдвиги. Поскольку ПМГ относится к классу регуляторных нейропептидов [1, 23], можно предположить, что, подобно другим пред-

ставителям этого класса, он является одним из элементов сложной нейропептидной регуляторной системы, которая контролирует различные функции клеток щитовидной железы — пролиферацию, дифференцировку, функциональную активность, опухолевый рост. Результаты проведенных нами исследований, свидетельствующие о стимулирующем влиянии ПМГ на функциональное состояние и пролиферативную активность тироцитов, могут представлять интерес в связи с поиском факторов, регулирующих рост щитовидной железы. Выявление таких факторов особенно важно вследствие чрезвычайной распространенности заболеваний, связанных с нарушением пролиферации тироцитов, которое лежит в основе развития зоба, доброкачественных и злокачественных новообразований этого органа.

Авторы искренне благодарят заведующую лабораторией синтеза пептидов Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ и СР РФ (Москва) Ж. Д. Беспалову за ПМГ, любезно предоставленный для проведения экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Обухова Н.Ф. Регуляторные пептиды, функционально непрерывная совокупность // Биохимия. 1985. Т. 51, № 4. С. 531–545.
2. Балобанова Э.Ф., Крещенко Н.Д. Действие морфогена гидры на развитие насекомых // Онтогенез. 1988. № 5. С. 533.
3. Быков В.Л. К методике гистохимического и морфометрического изучения возрастных изменений щитовидной железы // Труды Ленинградск. науч. общ-ва патологоанат. Л., 1976. Вып. 17. С. 181–183.
4. Быков В.Л. Стереологический анализ щитовидной железы (обзор методов) // Арх. анат. 1979. Т. 77, вып. 7. С. 124–132.
5. Вараксин А.А., Виноградов В.А., Мотавкин П.А. и др. Локализация пептидного морфогена гидры в нейронах мозга у человека // Арх. анат. 1987. Т. 93, вып. 9. С. 34–36.
6. Введение в количественную гистохимию ферментов / Под ред. Т.Б. Журавлевой. Л.: Медицина, 1978.
7. Виноградов В.А. Пептидный морфоген гидры: роль у млекопитающих // Онтогенез. 1988. Т. 19, № 5. С. 536.
8. Клечиков В.З., Плинер Л.И. Особенности выявления и цитофотометрической оценки активности ферментов в срезах щитовидной железы // Бюл. eksper. биол. 1974. Т. 78, № 8. С. 111–114.
9. Кулаева В.В., Быков В.Л. Реакция эпителия на пептидный морфоген гидры: гистологический и количественный анализ. Современные проблемы морфологии. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского отделения ВНОАГЭ, 2006. Вып. 1. С. 58–59.
10. Кулаева В.В., Быков В.Л. Морфометрическая и гистохимическая характеристика эпителия языка при введении пептидного морфогена гидры // Морфология. 2006. Т. 130, вып. 5. С. 56.

11. Лебедько О.А., Тимошин С.С., Рубина А.Ю. Влияние пептидного морфогена гидры, его аналога и фрагментов на синтез ДНК в эпителии и гладкомышечных клетках трахеи новорожденных белых крыс // Бюл. exper. биол. 2000. Т. 129, № 6. С. 646–648.
12. Лойда Э., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1982.
13. Луппа Х. Основы гистохимии. М.: Мир, 1980.
14. Мурзина Н.Б., Хомичук А.Ю., Тимошин С.С. и др. Влияние пептидного морфогена гидры на уровень β -эндорфина и некоторых гормонов крови и надпочечников белых крыс // Бюл. exper. биол. 1991. Т. 112, № 10. С. 433–435.
15. Павлов А.В. Митотическая активность фолликулярных и парафолликулярных (С-) клеток щитовидной железы крыс при гиперкальциемии // Морфология. 1992. Т. 102, вып. 6. С. 99–105.
16. Рубина А.Ю. Синтез и исследование пептидного морфогена гидры и его структурных аналогов // Онтогенез. 1992. Т. 23, № 3. С. 311–313.
17. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова / Под ред. Э.Э. Звартау. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003.
18. Трясучева И.Г., Милосердов Ю.В., Тищенко В.А., Виноградов В.А. Динамика пептидного морфогена гидры при менингитах // Тер. арх. 1990. Т. 143, № 2. С. 104–106.
19. Хмельницкий О.К. О возможностях и ограничениях морфологического изучения щитовидной железы // Арх. пат. 1993. Т. 55, № 5. С. 5–10.
20. Хомичук А.Ю. Влияние пептидного морфогена гидры на пролиферативные процессы в эпителиальной ткани белых крыс: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1995.
21. Юкина Г.Ю., Быков В.Л. Морфофункциональные изменения щитовидной железы при введении циклофосфана и их обратимость // Морфология. 2001. Т. 120, вып. 4. С. 56–59.
22. Юкина Г.Ю., Неворотин А.И., Быков В.Л. Влияние циклофосфана на ультраструктурные и метаболические характеристики тироцитов // Морфология. 2004. Т. 125, вып. 1. С. 66–71.
23. Endogenous Regulatory Peptides: Chemistry, Biology, and Medical Significance / Ed. J. Menyhart. Budapest: Akademiai Kiado, 2002.
24. Fuentes E.J., Mescher A.L., Ekman R. et al. Expression of hydra head activator in newt tissues and effect on limb regeneration // In Vivo. 1993. Vol. 7, № 1. P. 59–63.
25. Kimura T., Van Keymeulen A., Golstein J. et al. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models // Endocr. Rev. 2001. Vol. 22, № 5. P. 631–656.
26. Lohmann J.U., Bosch T.C. The novel peptide HEADY specifies apical fate in a simple radially symmetric metazoan // Genes Dev. 2000. Vol. 14. P. 2771–2777.
27. Sakura H., Aoki S., Ozawa T. et al. The neuropeptide, head activator, in human placenta and serum from pregnant women // Acta Endocrinol. (Copenh). 1991. Vol. 125, № 5. P. 454–458.
28. Schaller H.C., Bodenmuller H., Zachmann B. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the neuropeptide 'head activator' // Eur. J. Biochem. 1984. Vol. 138, № 2. P. 365–371.
29. Schaller H.C., Hoffmeister S.A., Dubel S. Role of the neuropeptide head activator for growth and development in hydra and mammals // Development. 1989. Suppl. 107. P. 99–107.

Поступила в редакцию 15.10.2015

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE THYROID GLAND AFTER ADMINISTRATION OF HYDRA PEPTIDE MORPHOGEN

V.V.Kulayeva, V.L.Bykov

The effect of Hydra peptide morphogen (HPM) on quantitative histochemical and morphometric parameters of the thyroid gland (TG) was studied. The experiments were conducted on 40 outbred albino male mice weighing 20–25 g, which were injected intraperitoneally with HPM at the dose of 100 μ g/kg of body weight per day for 5 days. Relative volumes occupied by the epithelium (E), including its follicular (E_f), interfollicular (E_i) components, and colloid (C) were determined using stereological method on TG transverse sections. E_f/E_i and E/C ratios were calculated as the indices of follicular organization and TG activity, respectively. Mitotic activity of thyrocytes was also evaluated. The enzymes, characterizing the metabolic activity of thyrocytes: NADH-diaphorase, succinate- and lactate dehydrogenases were demonstrated on cryostat sections of material, frozen in liquid nitrogen and their activity was assessed cytophotometrically. The results demonstrated that HPM administration lead to a significant increase in relative volume of thyroid epithelium with a concomitant reduction of the volume of the colloid. E_f/E_i ratio was not significantly different from that in the control. HPM also induced a significant increase of thyrocyte proliferation rate and of the activity of enzymes studied. Collectively, the quantitative histoenzymological and morphometric data obtained indicate the stimulating effect of HPM on TG functional activity and thyrocyte proliferation.

Key words: thyroid gland, morphometry, histochemistry, enzymes, Hydra peptide morphogen

Department of Histology, Embryology and Cytology, First St. Petersburg I.P.Pavlov State Medical University