

Abstract

*Kashchenko S. A.,
Erokhina V. V. *,
Lugansk State Medical
University,
1g 50-letia Oborony
Luganska St., Lugansk, 91045,
Ukraine*

FEATURES OF THE ULTRAMICROSCOPIC STRUCTURE OF THE PARATHYROID GLANDS IN MATURE RATS AFTER IMMUNOSUPPRESSION

The structure of the parathyroid glands actively responds to the action of various exogenous factors, but information about morphological features of the structure of the organ during immune status changing is limited. The objective of the work was to study features of electron-microscopic structure of the rat parathyroid glands under immunosuppression caused by the administration of cyclophosphamide.

The study was carried out on 24 male rats of reproductive age with initial body weight 180 ± 10 g. Maintenance and care of animals conducted in accordance with the norms of bioethics. The animals received an intramuscular injection of cyclophosphamide at a dose of 200 mg/kg. The animals were sacrificed on the 3rd and 30th day after the given injection. We studied the ultrastructure of the rats' parathyroid glands in norm as well as after immunosuppression.

The parenchyma of the parathyroid glands of intact animals consisted of two types of cells: chief cells and oxyphil cells. The ultrastructure of parathyroid chief cells and the mode of secretion were typical to other polypeptide-secreting endocrine cells. Those features correlated with the cells functional activity. The polyhedral, slightly eosinophilic chief cells were more numerous and formed irregular, anastomosing cords supported by delicate connective tissue. Oxyphils, which appeared after the first decade of life, were larger, more acidophilic cells that were irregularly distributed and occurred singly or in clumps. Using electron microscopy we detected that oxyphils were packed with mitochondria but, unlike chief cells, they lacked secretory vesicles; they are thought to be nonsecretory. Fat cells were also found in the parenchyma. The introduction of cyclophosphamide into the rat's organism at high doses caused certain changes in the ultrastructure of the organ. We observed polymorphism of cell nuclei; reduction in the diameter of the vessels of the microcirculation; reduction in the number of secretory granules; increase in the number of lipid and colloid droplets in the cell cytoplasm on 3rd day. We noticed tendency to normalization of morphological structure of the organ after the administration of cyclophosphamide on the 30th day.

Key words: parathyroid gland, rats, ultrastructure, parathyroid cell, cyclophosphamide.

Corresponding author: * sha1936@rambler.ru

Резюме

Кащенко С. А.,
Ерохина В. В. *,
Луганский государственный
медицинский университет,
ул. 50-летия Обороны
Луганска, 1 г, Луганск, 91045,
Украина

Резюме

Кащенко С. А., Єрохіна В. В. *,
Луганський державний
медичний університет,
вул. 50-річчя Оборони
Луганська, 1г, Луганськ,
91045, Україна

**ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКОГО
СТРОЕНИЯ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ
ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ИММУНОСУПРЕССИИ**

Целью работы было изучение ультрамикроскопического строения парашитовидных желез белых крыс в условиях иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана. Исследование проведено на 24 крысах-самцах с исходной массой тела (180 ± 10) г, которым вводили циклофосфан однократно внутримышечно в дозировке 200 мг/кг. Парашитовидные железы исследовали на 3-е и 30-е сутки после инъекции циклофосфана. Изучали электронно-микроскопическое строение органа у крыс контрольной группы и после иммуносупрессии. Установлено, что введение циклофосфана в высокой дозировке вызывает выраженные изменения в ультраструктуре парашитовидных желез. В ранние сроки наблюдения (3-е сутки) выявляется полиморфизм ядер паратироцитов, снижение количества секреторных гранул, увеличение численности липидных и коллоидных капель в цитоплазме клеток. На 30-е сутки после введения циклофосфана отмечается тенденция к нормализации морфоструктуры органа.

Ключевые слова: парашитовидная железа, крысы, ультраструктура, эндокринный паратироцит, циклофосфан.

**ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНОЇ БУДОВИ
ПАРАЩИТОПОДІБНИХ ЗАЛОЗ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ
ПІСЛЯ ІМУНОСУПРЕСІЇ**

Метою роботи було вивчення ультрамікроскопічної будови парашитоподібних залоз білих щурів в умовах імуносупресії, викликаній введенням циклофосфану. Дослідження проведено на 24 щурах-самцях з вихідною масою тіла (180 ± 10) г, яким вводили циклофосфан одноразово внутрішньом'язово в дозуванні 200 мг/кг. Парашитоподібні залози вивчали на 3-тю та 30-ту добу після ін'єкції циклофосфану. Досліджували електронно-мікроскопічну будову залоз щурів контрольної групи та після імуносупресії. Встановлено, що введення циклофосфану у високому дозуванні викликає виражені зміни в ультраструктурі органу. У ранні терміни спостереження (3-тя доба) виявляється поліморфізм ядер паратироцитів, зниження кількості секреторних гранул, збільшення кількості ліпідних і колоїдних крапель у цитоплазмі клітин. На 30-ту добу після введення циклофосфану відзначається тенденція до нормалізації морфоструктури органу.

Ключові слова: парашитоподібна залоза, щури, ультраструктура, ендокринний паратироцит, циклофосфан.

Автор, ответственный за корреспонденцию: * sha1936@rambler.ru

Введение

В последние десятилетия усилилось негативное влияние экологически неблагоприятных факторов на функциональную активность иммунной системы людей, которые постоянно проживают в условиях экологически

загрязненных регионов. Ухудшение экологии в сочетании с другими неблагоприятными социально-экономическими факторами приводит к увеличению количества иммунореактивных состояний у населения [1, 2].

Эндокринная и иммунная системы тесно взаимодействуют между собой, образуя единый механизм регуляции гомеостаза организма. Установлено, что различные гормоны воздействуют на состояние иммунокомпетентных клеток и оказывают выраженное влияние на течение иммунных реакций, в свою очередь, иммунная система влияет на эндокринную [3, 4, 5]. На сегодняшний день установлено прямое воздействие иммунной системы на изменение функциональной активности остеогенных клеток. В комплексных исследованиях получены данные о взаимодействии костной и иммунной систем [5, 6, 7]. С другой стороны, функционирование костной ткани напрямую зависит от деятельности паращитовидных желез. Последние вырабатывают паратгормон, физиологическое действие которого заключается в угнетении формирования костной ткани посредством влияния на популяцию остеобластов и остеоцитов [8]. Таким образом, между эндокринной, иммунной и костной системами существует тесная взаимосвязь. Поэтому исследование особенностей строения паращитовидных желез в условиях изменения иммунного статуса организма является актуальным направлением экспериментальной медицины.

Учитывая массовость распространения онкологических заболеваний среди населения, в клинической практике широко используются цитостатические препараты. Одним из препаратов выбора для лечения онкопатологии является препарат алкилирующего типа действия «циклофосфан», который имеет высокую противоопухолевую активность, а также иммуносупрессивное действие [9]. Паращитовидные железы обладают выраженной способностью к морфоперестройке под влиянием разнообразных эндогенных и экзогенных факторов [10, 11, 12]. При изучении данного органа отечественные и зарубежные авторы в большинстве своем делают акцент на иммунологические и иммуногистохимические исследования [5, 10]. Морфологические аспекты строения паращитовидных желез при изменении иммунного статуса организма до настоящего времени не исследованы. Данные относительно морфореактивности паращитовидных желез на ультрамикроскопическом уровне после введения цитостатических препаратов

отсутствуют, поэтому изучение этого вопроса вызывает особый интерес.

Работа проведена в рамках научно-исследовательской темы кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии «Особенности строения органов иммунной, эндокринной и нервной систем при иммуностимуляции и иммуносупрессии» ГЗ «Луганский государственный медицинский университет», номер государственной регистрации 0112U000096.

Целью настоящего исследования было изучение ультрамикроскопического строения паращитовидных желез белых крыс в условиях иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана.

Материалы и методы

В качестве подопытных животных были использованы 24 белые беспородные крысы-самцы половозрелого возрастного периода с исходной массой тела (180 ± 10) г, полученные из вивария лабораторных животных ГЗ «Луганский государственный медицинский университет». Эксперимент был проведен в соответствии с общепринятыми требованиями биоэтики (протокол № 1 от 14.02.2013 г. заседания комиссии по вопросам биоэтики ГЗ «Луганский государственный медицинский университет») [13]. Иммуносупрессия достигалась с помощью введения алкилирующего цитостатического препарата циклофосфана в дозировке 200 мг/кг однократно внутримышечно. Данный препарат широко используется в клинической практике как иммуносупрессор для угнетения пролиферации лимфоцитарных клонов. Контролем служили интактные животные, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. После окончания сроков наблюдения (3-е и 30-е сутки) животных выводили из эксперимента. Для электронно-микроскопического исследования кусочки паращитовидной железы размером 1 мм³ погружали в глутаральдегидный фиксатор по Карновскому на 24 часа, затем помещали в 1 % тетраоксид осмия по Палладе на 1 час. После дегидратации в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне материал заливали смесью эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полимеризацию проводили на протяжении 36 часов при 56 °С. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме УМТП-4 Сумского ПО «Электрон»,

контрастировали в насыщенном растворе уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу и просматривали в электронном микроскопе EM-125. Исследовали ультраструктуру эндокринных паратироцитов при увеличении $\times 8000$.

Результаты и их обсуждение

По данным электронно-микроскопического исследования парашитовидная железа крыс контрольной группы состоит из двух типов клеток: главных паратироцитов и оксифильных паратироцитов. В свою очередь, среди главных паратироцитов встречаются два типа клеток: светлые «покоящиеся» и темные «активные», ультраструктура которых строго коррелирует с их функциональной активностью.

Светлые паратироциты имеют полигональную форму и тесно прилегают друг к другу, располагаясь радиально вокруг многочисленных капилляров. Контуров клеток неровные, плазматическая мембрана образует множество интердигитаций, разнообразных по форме и степени сложности. Клеточные оболочки соседних паратироцитов, включая интердигитации, расположены параллельно друг другу и отделены межклеточной щелью. Однако иногда плазматические мембраны несколько расходятся, образуя локальные расширения. В сосудистом полюсе, непосредственно под плазматической мембраной, наблюдается базальная мембрана. Соседние паратироциты соединены между собой мощными соединительными комплексами, включающими в себя десмосомы и зоны облитерации (пятислойные структуры), подобные апикальным замыкающим пластинкам между тироцитами.

Ядра паратироцитов расположены эксцентрично, то ближе, то дальше от просвета капилляра, и часто имеют неровные контуры с инвагинациями ядерной оболочки разной глубины. Хроматин образует заметные скопления вблизи внутренней мембраны кариолеммы. Ядрышки на срезах встречаются довольно редко и имеют небольшие размеры. Эндоплазматическая сеть представлена уплощенными канальцами, находящимися обычно с одной стороны ядра или вблизи плазматической мембраны. В некоторых клетках канальцы ориентированы параллельно друг другу, их наружные мембраны покрыты небольшим количеством рибосом. В цитоплазме паратироцитов присутствуют многочисленные

свободные рибосомы, а также значительное количество полисом, которые придают гиалоплазме паратироцитов мелкозернистый вид и повышенную электронную плотность.

Комплекс Гольджи занимает довольно обширную перинуклеарную область и имеет подковообразную или кольцевидную форму. Он образован системой параллельно ориентированных уплощенных мешочков, редкими периферически расположенными вакуолями и большим количеством микропузырьков «окаймленного типа» средней электронной плотности, которые сосредоточены в основном во внутренней области. Среди микропузырьков в большинстве паратироцитов имеются более крупные гранулы, окруженные неотчетливой мембраной. Нередко такие гранулы обнаруживаются вблизи цитолеммы, особенно часто они расположены рядом с четко выраженными интердигитациями. Вокруг ядра и вблизи комплекса Гольджи выявляются многочисленные митохондрии, которые имеют удлиненную или округлую форму и отчетливые поперечные кристы (рис. 1, 2).

Кроме описанных типичных паратироцитов, в парашитовидной железе intactных крыс иногда встречаются и темные клетки. Темные главные клетки отличаются от светлых крупным ядром, параллельно расположенными цистернами ГЭПС, наличием хорошо развитого пластинчатого комплекса, везикулярные компоненты которого занимают значительные участки цитоплазмы. В этих клетках увеличивается численность секреторных гранул, а содержание гликогена уменьшается.

Через 3 суток после введения крысам циклофосфана морфологическая картина парашитовидных желез имеет некоторые особенности. Паратироциты более вытянутые по сравнению с клетками intactных животных, количество интердигитаций между ними уменьшается. Для ядер паратироцитов характерен выраженный полиморфизм. Практически все они имеют глубокие единичные или множественные вырезки на боковой поверхности. Гетерохроматин более выражен, располагается на периферии ядер в виде глыбок. В цитоплазме большинства паратироцитов intactных крыс выявляется различное количество липидных и коллоидных капель с ровными или несколько зазубренными контурами, на периферии клеток возрастает численность лизосом.

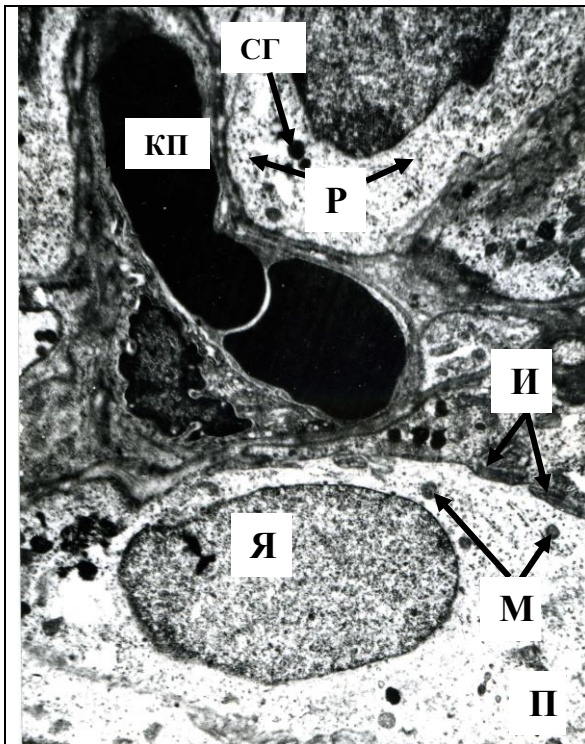


Рис. 1. Паращитовидная железа крысы контрольной группы: П – паратироцит, Я – ядро, Р – рибосомы, СГ – секреторные гранулы, КП – кровеносный капилляр, М – митохондрии, И – интердигитации. x8000

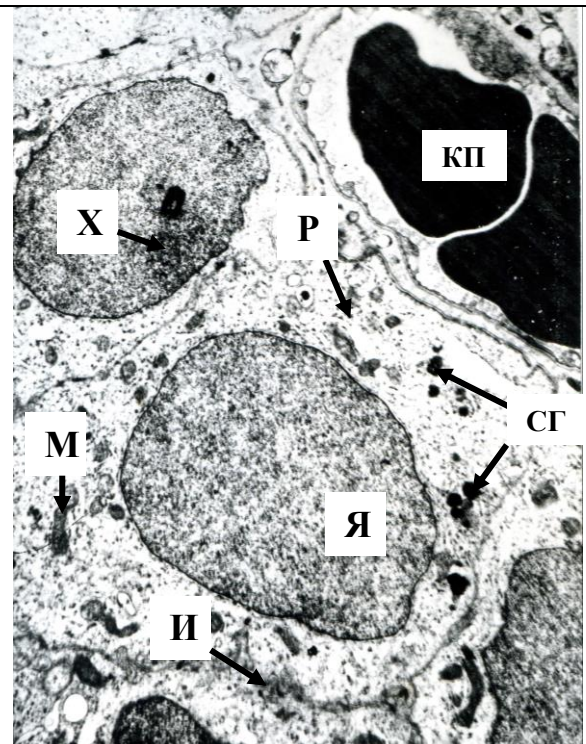


Рис. 2. Паращитовидная железа крысы контрольной группы: Я – ядро, КП – кровеносный капилляр, М – митохондрии, СГ – секреторные гранулы, Х – хроматин, Р – рибосомы, И – интердигитации. x8000

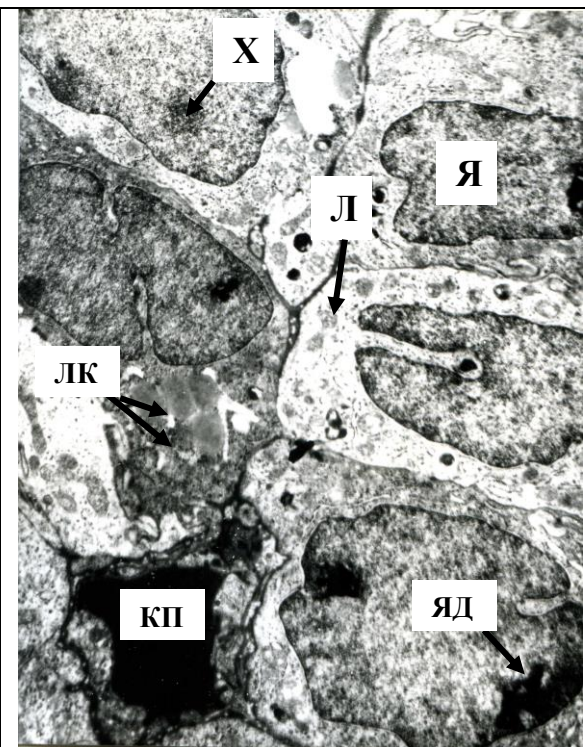


Рис. 3. Паращитовидная железа крысы на 3-и сутки после введения циклофосфана: Я – ядро, ЯД – ядрышко, Л – лизосома, Х – хроматин, ЛК – липидные капли, КП – кровеносный капилляр. x8000

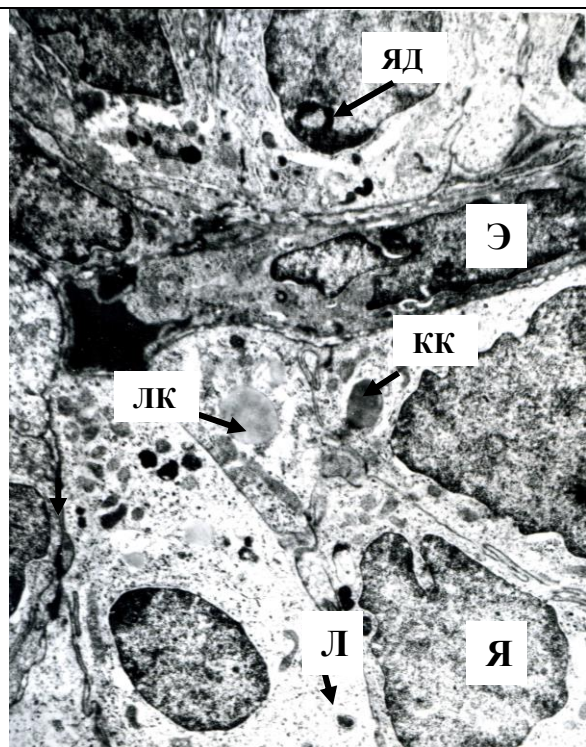


Рис. 4. Паращитовидная железа крысы на 3-и сутки после введения циклофосфана: Я – ядро, ЯД – ядрышко, ЛК – липидная капля, КК – коллоидная капля, Л – лизосома, Э – эндотелиоцит. x8000

Уменьшается количество секреторных гранул, что, возможно, связано со снижением функциональной активности клеток (рис. 3, 4).

На 30-е сутки после введения крысам циклофосфана морфологическая картина паращитовидных желез полиморфна. Встречаются единичные клетки, содержащие электронноплотные ядра с инвагинациями. В целом прослеживается тенденция к нормализации формы клеток и ядер. Интердигитации между клетками четко обозначены. Количество секреторных гранул уменьшено по сравнению с таковым у контрольных животных. На периферии паратироцитов расположены липидные капли и лизосомы различной электронной плотности (рис. 5, 6).

Ряд клинических и экспериментальных исследований предыдущих лет подтверждают сведения о высокой морфоактивности паращитовидных желез. В работах Н. Chen с соавторами (2001) была изучена ультраструктура паращитовидных желез у крыс

линии Wistar, которые содержались на диете с низким содержанием кальция. При данных условиях эксперимента отмечены стимуляция деятельности паращитовидных желез и активация секреторных процессов в клетках. Выявлено высокое развитие гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи в цитоплазме клеток, а также митотически делящиеся клетки [14]. В экспериментальных исследованиях S. I. Roth и L. G. Raisz (1966) показано снижение секреторной активности клеток паращитовидных желез у беспородных крыс при повышении уровня кальция в сыворотке крови [15]. Т. Setoguti и соавторы (1985) в своих работах классифицирует секреторные гранулы паратироцитов белых крыс в зависимости от их диаметра на две группы. Количество мелких секреторных гранул (диаметром до 300 нм) уменьшается при увеличении концентрации кальция в сыворотке крови, а количество крупных гранул (диаметром более 300 нм) остается стабильным [16].

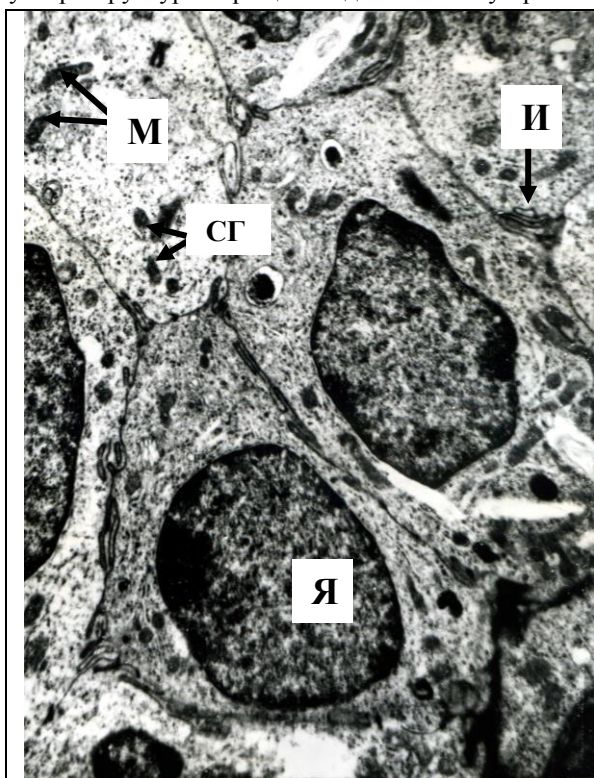


Рис. 5. Паращитовидная железа крысы на 30-и сутки после введения циклофосфана: Я – ядро, М – митохондрии, И – интердигитации, СГ – секреторные гранулы. x8000

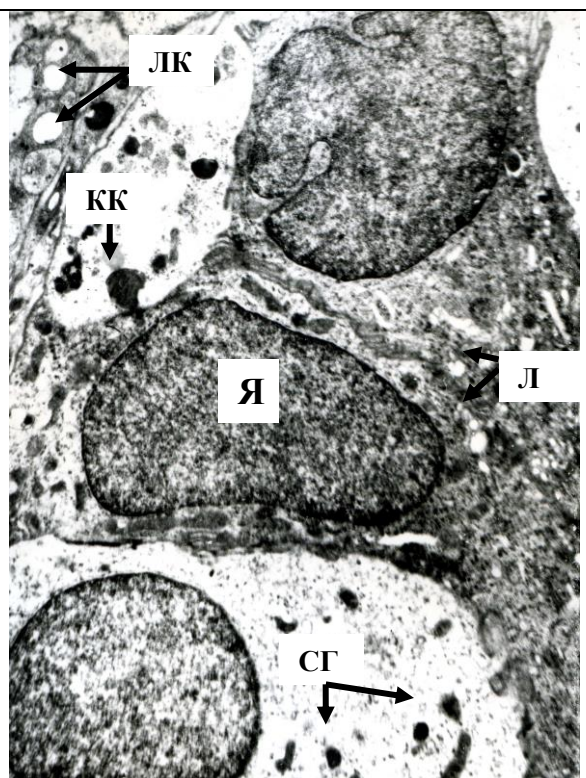


Рис. 6. Паращитовидная железа крысы на 30-и сутки после введения циклофосфана: Я – ядро, ЛК – липидные капли, Л – лизосомы, КК – коллоидная капля, СГ – секреторные гранулы. x8000

В последние десятилетия данное направление экспериментальной медицины находится за пределами поля зрения исследователей. В литературе отсутствуют данные, которые освещают особенности ультрамикроскопического строения паращитовидных желез в условиях иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана.

Выводы

1. Однократное введение циклофосфана в дозе 200 мг/кг крысам-самцам вызывает выраженные изменения в ультраструктуре паращитовидных желез, что свидетельствует об их реактивности в ответ на иммуноотропное воздействие.
2. В ранние сроки наблюдения (3-и сутки) выявляется выраженный полиморфизм ядер паратироцитов, снижение количества секреторных гранул, увеличение численности липидных и коллоидных капель в цитоплазме клеток.
3. На 30-и сутки после введения циклофосфана отмечается тенденция к нормализации морфоструктуры органа, однако, полного восстановления не происходит.

Перспективы дальнейших исследований

В дальнейших публикациях планируется осветить вопросы морфоструктуры паращитовидных желез в условиях иммуносупрессии и иммуностимуляции.

References (список литературы)

1. Zeise L, Bois FY, Chiu WA. Addressing human variability in next-generation human health risk assessments of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(1):23–31. doi: 10.1289/ehp.1205687
2. Flachs EM, Sorensen J, Bonlokke J. Population dynamics and air pollution: the impact of demographics on health impact assessment of air pollution. *Journal of Environmental and Public Health*. 2013;2013(1):1–12. doi: 10.1155/2013/760259
3. Comsa J, Leonhardt H, Wekerle H. Hormonal coordination of the immune response. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 1982;92:115–191.

4. Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Conversation galante: how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmunity Reviews*. 2007;7(1):23–9.
5. Geara AS, Castellanos MR, Bassil C, Schuller-Levis G, Park E, Smith M, Goldman M, Elsayegh S. Effects of parathyroid hormone on immune function. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010. doi: 10.1155/2010/418695.
6. Kashchenko SA. [Correlation between skeletal, immune systems and endocrine glands after application of timogen]. *Ukrainskij medichnij almanah*. 2008;11(3):80–82.
7. Takayanadi H. Interaction between the immune system and bone metabolism: an emerging field of osteoimmunology. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*. 2007;83(5):136–143.
8. Irvin G. Parathormone and the disease. *The American Journal of Surgery*. 2007;193:301–304.
9. Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, Hamasaki K, Nakao K, Ishii N, Nagayama Y, Eguchi K. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncology Reports*. 2006;16(1):141–146.
10. Banek T, Banek L, Pezerovic-Panijan R. Morphology of healthy human parathyroid glands in cytologic smears. *Nongynecologic Cytopathology*. 2005;49(6):627–633.
11. Cinti S, Sbarbati A. Ultrastructure of human parathyroid cells in health and disease. *Microscopy Research and Technique*. 1995;32:164–179.
12. Chatyingmongcol K, Roonnguangchai J, Pilakasiri K. The ultrastructure of the parathyroid gland in cadaveric embalmed specimens. *Siriraj Medical Journal*. 2008;60(1):7–9.
13. Lolas F. Bioethics and animal research. A personal perspective and a note on the contribution of Fritz Jahr. *Biological Research*. 2008;41(1):119–23.
14. Chen H, Hayakawa D, Emura S. Effect of low calcium diet on the structure of the rat parathyroid gland. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*. 2001;78(5):153–160.

15. Roth SI, Raisz LG. [The course and reversibility of the calcium effect on the ultrastructure of rat parathyroid gland in organ culture. *Laboratory Investigation*. 1966;15:1187–1211.
16. Setoguti T, Inoue Y, Shin M. Effect of short-term treatment with calcium on the parathyroid gland of the rat, under particular

consideration of the alteration of storage granules. *Cell and Tissue Research*. 1985;240:9–17.

(received 28.04.2014, published online 05.07.2014)

(получено 28.04.2014, опубліковано 05.07.2014)