

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ АЦИДОФИЛЬНЫХ ЭНДОКРИНОЦИТОВ АДЕНОГИПОФИЗА КРЫС ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА

*И.В. Бобрышева**

*Луганский государственный медицинский университет (Украина)

Представление о клеточных и тканевых механизмах, лежащих в основе перестройки аденогипофиза при иммуносупрессии, необходимо для возможной коррекции терапии больных, получающих цитостатики при лечении аутоиммунных, онкологических заболеваний, при трансплантации органов и тканей. Цель исследования – изучить особенности структурных преобразований ацидофильных эндокриноцитов дистальной части аденогипофиза крыс периода полового созревания на фоне экспериментальной иммуносупрессии. Исследование проведено на 60 белых беспородных крысах-самцах периода полового созревания массой 40–60 г. Иммуносупрессивное состояние у животных моделировали путем введения цитостатического препарата циклофосфамида (циклофосфана). Морфометрические показатели ацидофильных эндокриноцитов оценивали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином по методу Маллори, а также на ультратонких срезах. Установлено, что в ранние сроки наблюдения после введения цитостатика структурные изменения ацидофильных эндокриноцитов аденогипофиза свидетельствуют о повышении их функциональной активности (увеличение площади клеток и их ядер, снижение ядерно-цитоплазматического отношения, повышение относительной площади ядрышек и митохондрий, секреторных гранул и индекса активности гранул). На 15-е и 30-е сутки наблюдаются выраженные деструктивно-дистрофические изменения ядерных и цитоплазматических структур эндокринных клеток, сопровождающиеся снижением продукции гормонов. Через 60 сут после введения циклофосфамида ультраструктурные характеристики и морфометрические показатели изученных эндокринных клеток практически не отличаются от контрольных данных. Таким образом, введение циклофосфамида подопытным животным периода полового созревания вызывает активную ответную реакцию ацидофильных эндокриноцитов дистальной части аденогипофиза, проявляющуюся морфологическими изменениями и количественными сдвигами морфометрических показателей, для которых характерна стадийность.

Ключевые слова: крысы, аденогипофиз, ацидофильные эндокриноциты, иммуносупрессия.

Ответственный за переписку: Бобрышева Инесса Венидиктовна, адрес: Украина, 91045, г. Луганск, квартал 50-летия Обороны Луганска, д. 1; e-mail: inessa_lug@mail.ru

В последнее время установлено, что гормоны аденогипофиза способны изменять активность метаболизма и функции клеток иммунной системы, оказывать выраженное влияние на течение иммунных реакций [1, 2]. Вместе с тем изменение активности органов иммунной системы может воздействовать на состояние эндокринных функций [3]. Многочисленными исследованиями доказано, что аденогипофиз чрезвычайно чувствителен к действию различных экзо- и эндогенных факторов [4–6]. Представление о клеточных и тканевых механизмах, лежащих в основе перестройки аденогипофиза при иммуносупрессии, необходимо для возможной коррекции терапии больных, получающих цитостатики при лечении аутоиммунных, онкологических заболеваний, при трансплантации органов и тканей.

На сегодняшний день в научной литературе практически отсутствуют данные об особенностях цитоархитектоники (в том числе ультрамикроскопического строения клеток) аденогипофиза при иммуносупрессивном состоянии организма. Остаются неизученными адаптационные резервы аденогипофиза в зависимости от возраста.

Цель исследования – изучить особенности структурных преобразований ацидофильных эндокриноцитов дистальной части аденогипофиза крыс периода полового созревания на фоне экспериментальной иммуносупрессии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 60 белых беспородных крысах-самцах периода полового созревания массой 40–60 г. Иммуносупрессивное состояние моделировали путем однократного внутримышечного введения цитостатического препарата циклофосфамида (циклофосфана) в дозе, приводящей к иммунной супрессии (200 мг/кг) [7]. В группу контроля входили крысы, получавшие 0,9 %-й раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Выведение животных из эксперимента осуществляли через 1, 7, 15, 30 и 60 сут после

инъекции препарата путем декапитации под эфирным наркозом [8].

Объектом исследования служил гипофиз. После забора материала и стандартной гистологической проводки срезы окрашивали гематоксилином и эозином по методу Маллори, а также Гримелиуса (импрегнация нитратом серебра), что давало возможность дифференцировать различные виды эндокриноцитов [9–11].

Изучение деталей гистологического строения и морфометрические исследования проводили с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего микроскоп «Olympus CX41» и цифровой фотоаппарат «Olympus SP-500UZ», с использованием компьютерной программы «Morpholog» [12]. Кроме изучения препаратов общепринятыми гистологическими методами под световым микроскопом выполняли морфометрическое исследование ацидофильных эндокриноцитов: определение диаметров, площадей клеток, их ядер, а также площади цитоплазмы с последующим вычислением ядерно-цитоплазматического отношения; кроме того, вычисляли процентное содержание различных видов эндокриноцитов.

Для ультрамикроскопического исследования кусочки гипофиза фиксировали и заключали в эпон-аралдит. Осмотр и фотографирование срезов проводили на электронном микроскопе EM-125 (ПО «Электрон», Украина). На ультратонких срезах определяли: относительную площадь (в процентах), занимаемую ядрышками эндокриноцитов по отношению к общей площади поперечного сечения ядра; относительную площадь, занимаемую митохондриями и гормонсодержащими гранулами по отношению к общей площади цитоплазмы; относительную площадь, занимаемую активными гранулами (полными, имеющими типичное строение), а также неактивными гранулами (светлыми, лишенными электронноплотной субстанции, а также частично или полностью разрушенными) по отношению к общей пло-

щади цитоплазмы; индекс отношения площади активных гормонсодержащих гранул к площади неактивных гранул на фиксированной площади цитоплазмы.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Результаты обрабатывали при помощи пакета программ Statistica 6.0. Достоверными считали данные с погрешностью менее 5 % ($p < 0,05$ в тексте и на рисунках обозначено *).

Результаты и обсуждение. При исследовании дистальной части аденогипофиза крыс-самцов периода полового созревания с помощью световой микроскопии ацидофильные эндокриноциты (АФЭ) располагаются диффузно, имеют округлую или овальную форму, содержат крупное, округлое, эксцентрично расположенное ядро. Процентное содержание АФЭ повышается на 1-е и 7-е сутки после применения цитостатика (на 12,56* и 4,94* %), что может быть обусловлено трансформацией хромофобных клеток в хромофильные в связи с их активацией и накоплением секреторных гранул в цитоплазме. Через 15 и 30 сут этот показатель ниже контрольных значений на 8,19* и 5,08* % соответственно.

Применение циклофосфида вызывает изменения морфометрических показателей АФЭ. На 1-е и 7-е сутки наблюдения площадь клеток статистически значимо больше контрольных данных, на 30-е сутки наблюдается снижение, а на 60-е сутки – нивелирование показателя относительно контроля. Изменение площади ядер имеет аналогичную динамику. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) снижается на 1-е, 7-е и 15-е сутки наблюдения, увеличивается на 30-е сутки и не отличается от контрольных значений на 60-е сутки (рис. 1).

Ультрамикроскопическое исследование показало, что АФЭ в аденогипофизе крыс-самцов периода полового созревания представлены соматотропными эндокриноцитами (СТЭ). Лактотропоциты у животных данного возраст-

го периода нами не обнаружены. СТЭ имеют округлую форму и относительно крупные размеры. Ядра содержат 1-2 ядрышка, которые часто прилежат к ядерной мембране.

При исследовании ультратонких срезов аденогипофиза в ранние сроки после введения препарата выявлено, что гранулярная эндоплазматическая сеть (ГЭС) в цитоплазме СТЭ имеет вид продольно расположенных трубочек, на мембранах которых размещается значительное количество рибосом, а в цистернах обнаруживаются скопления секреторного материала. Комплекс Гольджи имеет подковообразную форму и расположен возле одного из полюсов ядра. Митохондрии находятся вблизи цистерн ГЭС и комплекса Гольджи. Выявляется большое количество крупных секреторных гранул, которые размещаются диффузно по всей цитоплазме, однако в отдельных ее участках находятся вблизи плазмолеммы. При этом обращает на себя внимание полиморфизм гранул: они имеют разную электронную плотность. Площадь, занимаемая гранулами, возрастает через 1 сут после введения циклофосфида на 15,55* % по сравнению с контролем.

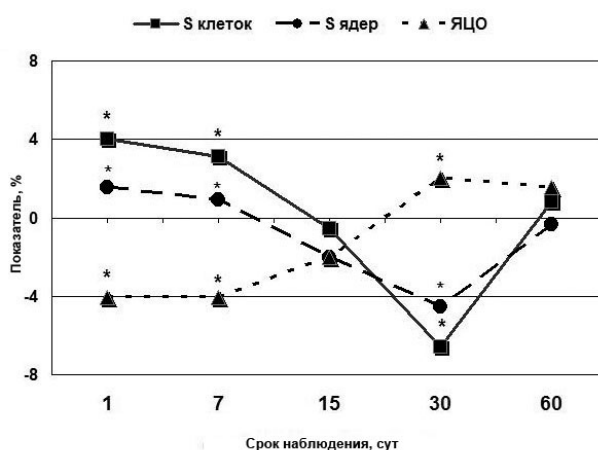


Рис. 1. Динамика средней площади клеток, их ядер и ЯЦО АФЭ аденогипофиза крыс периода полового созревания после введения циклофосфида

В последующем данный показатель снижается. Наряду с описанным типом СТЭ в аденогипофизе выявляются эндокриноциты, содержащие немногочисленные секреторные гранулы (рис. 2). В их цитоплазме наблюдается интенсивное развитие ГЭС и комплекса Гольджи, увеличение численности связанных и свободных рибосом.

На 15-е и 30-е сутки после введения цитостатика СТЭ подвергаются деструктивно-дистрофическим изменениям. При этом наблюдается

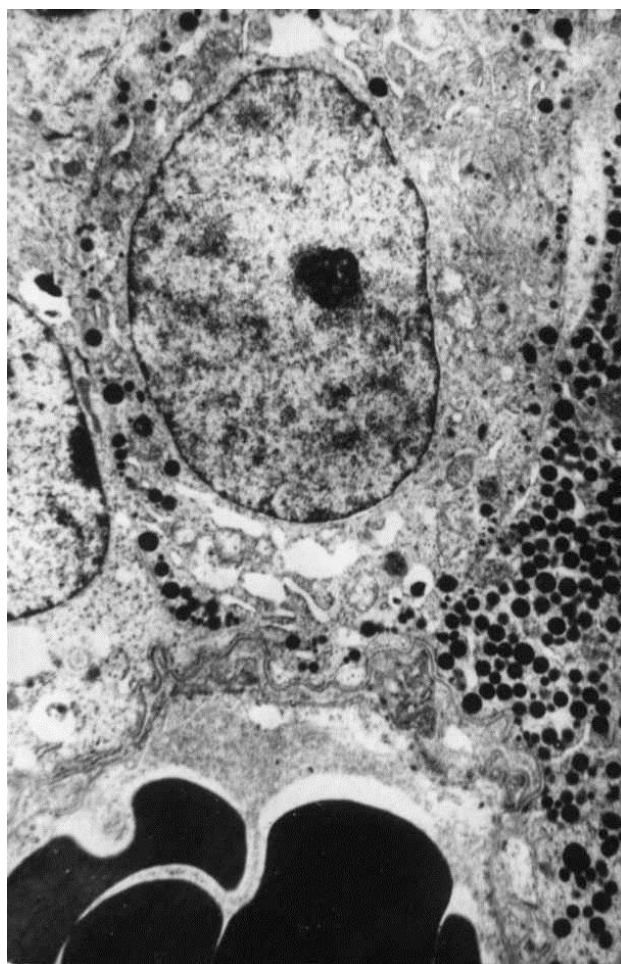


Рис. 2. Соматотропные эндокриноциты дистальной части аденогипофиза крысы периода полового созревания через 7 сут после введения циклофосфамида (увеличение $\times 8000$)

различная степень повреждения ультраструктуры клеток. В цитоплазме отмечаются мелкие и средние вакуоли неправильной формы, образовавшиеся в результате набухания и разрыва митохондрий, расширения и разрыва части цистерн ГЭС и комплекса Гольджи. Расширенные цистерны эндоплазматической сети содержат мембраны, практически лишенные рибосом на своей поверхности. Митохондрии подвергаются значительному набуханию, содержат просветленный матрикс, разрушенные кристы (рис. 3). При этом площадь митохондрий повышается на $9,68^* \%$ (15-е сутки) по сравнению с данными контрольной группы.

Часть СТЭ подвергаются более значительным дистрофическим изменениям. Их ядра ча-

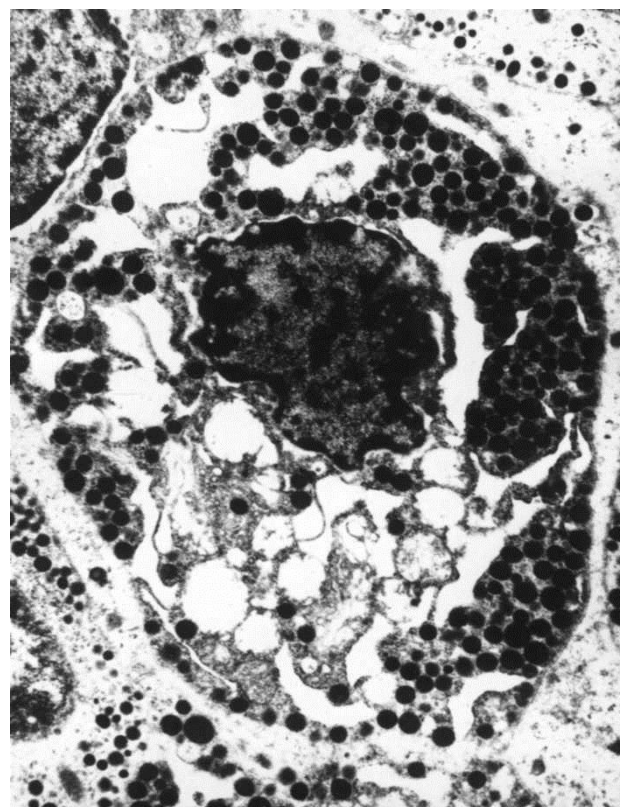


Рис. 3. Соматотропный эндокриноцит дистальной части аденогипофиза крысы периода полового созревания через 30 сут после введения циклофосфамида (увеличение $\times 12\ 000$)

сто имеют неправильную форму, перинуклеарное пространство прерывисто, неравномерно по ширине. Цистерны ГЭС резко расширены, частично разрушены. Цитоплазма приобретает ячеистую структуру. Сохраняются одиночные, увеличенные и просветленные митохондрии с деструктурированными кристами. Численность секреторных гранул снижена, среди них часто встречаются мелкие и полупустые, расположенные одиночно, цепочками или небольшими группами в остатках неизменной цитоплазмы.

Площадь ядрышек статистически значимо выше контрольных значений только через 1 сут после введения циклофосфида (на 7,56 %). Площадь митохондрий выше, чем в контроле, на 15-е и 30-е сутки (на 9,68 и 9,00 % соответственно).

Площадь гормонсодержащих гранул, так же как и индекс их активности, через 1 сут значительно превышает контрольные показатели. На 7, 15 и 30-е сутки наблюдаются достоверные негативные отличия указанных показателей от данных контрольной группы, а на 60-е сутки эти отличия не являются статистически значимыми (рис. 4).

К концу периода наблюдения (60-е сутки) количество клеток, имеющих типичное стро-

ение, увеличивается, структура большинства СТЭ, а также их морфометрические характеристики аналогичны контрольным данным.

Заключение. Введение циклофосфида подопытным животным периода полового созревания вызывает активную ответную реакцию СТЭ дистальной части аденогипофиза, которая характеризуется стадийностью развития морфологических изменений эндокринных клеток.

В ранние сроки наблюдения структурные изменения СТЭ (увеличение площади клеток и их ядер, повышение относительной площади ядрышек, митохондрий, секреторных гранул и индекса активности гранул) могут быть как морфологическим проявлением стадии активации клеток в ответ на введение цитостатика при развитии стрессовой реакции организма, так и являться результатом нарушения выведения гормона вследствие дистрофических процессов в структурах кровеносных сосудов и строме железы.

Наиболее выраженные деструктивно-дистрофические изменения ядерных и цитоплазматических структур в СТЭ, сопровождающиеся снижением продукции гормона, обнаружены на 15-е и 30-е сутки наблюдения. Можно полагать, что указанные изменения обусловлены непосредственным действием циклофосфида на мембранные органеллы клетки, прежде всего митохондрии, гранулярную эндоплазматическую сеть и комплекс Гольджи.

Через 60 сут после введения циклофосфида морфометрические показатели и ультраструктурные характеристики СТЭ практически не отличаются от контрольных данных, что свидетельствует о развитии репаративных процессов к клеткам.

Данные наблюдения позволяют сделать вывод, что однократное введение циклофосфида подопытным животным периода полового созревания в дозе 200 мг/кг вызывает выраженное негативное воздействие на СТЭ аденогипофиза, приводящее к временному снижению гормонопродуцирующей функции клеток.

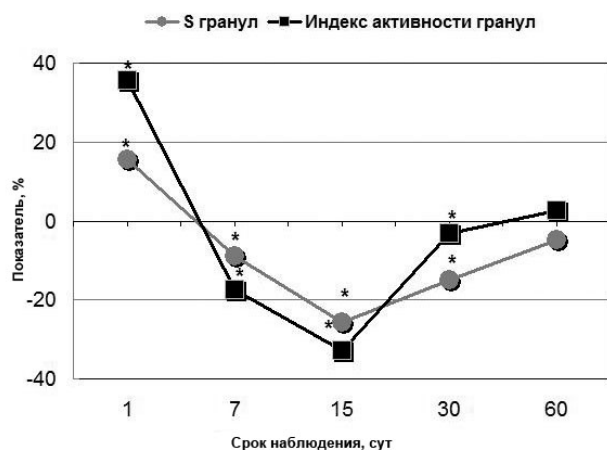


Рис. 4. Динамика площади и индекса активности гормонсодержащих гранул СТЭ аденогипофиза крыс периода полового созревания после введения циклофосфида

Список литературы

1. Казаков В.Н., Снегирь М.А., Снегирь А.Г., Гайдарова Е.В., Ивнев Б.Б., Натрус Л.В. Пути взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции функций организма // *Арх. клин. и эксперим. медицины*. 2004. Т. 13, № 1–2. С. 3–10.
2. Тыртышная Г.В., Парахонский А.П. Взаимосвязь нарушений иммунной и эндокринной систем при аутоиммунной патологии // *Соврем. наукоем. технологии*. 2007. № 2. С. 80–81.
3. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология: истоки и перспективы развития // *Успехи физиол. наук*. 2003. Т. 34, № 4. С. 4–15.
4. Большакова О.В. Морфологические изменения аденогипофиза при интоксикации свинцом // *Журн. анатомии и гистопатологии*. 2015. Т. 4, № 3. С. 28.
5. Волков В.П. Функциональная морфология аденогипофиза и коры надпочечников при антипсихотической терапии // *Universum: Медицина и фармакология: электрон. науч. журн*. 2014. № 10(11). URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1646> (дата обращения: 12.01.2016).
6. Кольтюкова Н.В., Самарин М.Ю. Структурные преобразования дистальной части аденогипофиза и надпочечников при многократных физических нагрузках // *Журн. анатомии и гистопатологии*. 2015. Т. 4, № 3. С. 62.
7. Лосева Л.Ф., Доненко Ф.В., Лебединская О.В. Некоторые особенности фармакодинамики циклофосфана у экспериментальных животных // *Мед. иммунология*. 2011. Т. 13, № 4–5. С. 52.
8. Западнюк В.И., Западнюк И.П., Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев, 1983. 254 с.
9. Бессалова Е.Ю. Возрастная макро-микрoанатомия гипофизов белых крыс // *Морфология*. 2011. Т. 5, № 3. С. 41–45.
10. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології: навчальний посібник. Житомир, 2005. 288 с.
11. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. Л., 1961. 423 с.
12. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Master of Morphology» / В.В. Овчаренко, В.В. Маврич. Свід. про реєстрацію авт. права на винахід № 9604, дата реєстрації 19.03.2004.

References

1. Kazakov V.N., Snegir' M.A., Snegir' A.G., Gaydarova E.V., Ivnev B.B., Natrus L.V. Puti vzaimodeystviya nervnoy, endokrinnoy i immunnnoy sistem v regulyatsii funktsiy organizma [Ways of Interaction Between the Nervous, Endocrine and Immune Systems in the Regulation of Body Functions]. *Arkhiv klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny*, 2004, vol. 13, no. 1–2, pp. 3–10.
2. Tyrtysnaya G.V., Parakhonskiy A.P. Vzaimosvyaz' narusheniy immunnnoy i endokrinnoy sistem pri autoimmunnnoy patologii [The Relationship Between Disorders of the Immune and Endocrine Systems in Autoimmune Pathology]. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*, 2007, no. 2, pp. 80–81.
3. Akmaev I.G. Neyroimmunoendokrinologiya: istoki i perspektivy razvitiya [Neuroimmunoendocrinology, Origins and Development Prospects]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, 2003, vol. 34, no. 4, pp. 4–15.
4. Bol'shakova O.V. Morfologicheskie izmeneniya adenogipofiza pri intoksikatsii svintsom [Morphological Changes of Adenohypophysis Under Lead Intoxication]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*, 2015, vol. 4, no. 3, p. 28.
5. Volkov V.P. Funktsional'naya morfologiya adenogipofiza i kory nadpochechnikov pri antipsikhoticheskoy terapii [Functional Morphology of the Anterior Pituitary and Adrenal Cortex in Antipsychotic Therapy]. *Universum: Meditsina i farmakologiya: elektronnyy nauchnyy zhurnal*, 2014, no. 10(11). Available at: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1646> (accessed 12 January 2016).
6. Kol'tyukova N.V., Samarin M.Yu. Strukturnye preobrazovaniya distal'noy chasti adenogipofiza i nadpochechnikov pri mnogokratnykh fizicheskikh nagruzkakh [Structural Reorganization of the Distal Adenohypophysis and Adrenal Glands During Long Physical Loads]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*, 2015, vol. 4, no. 3, p. 62.
7. Loseva L.F., Donenko F.V., Lebedinskaya O.V. Nekotorye osobennosti farmakodinamiki tsiklofosfana u eksperimental'nykh zhivotnykh [Some Features of Pharmacodynamics of Cyclophosphamide in Experimental Animals]. *Meditsinskaya immunologiya*, 2011, vol. 13, no. 4–5, p. 52.

8. Zapadnyuk V.I., Zapadnyuk I.P., Zakhariya E.A. *Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v eksperimente* [Laboratory Animals. Breeding, Rearing, Housing, and Use in Experiments]. Kiev, 1983. 254 p.

9. Bessalova E.Yu. Vozrastnaya makro-mikroanatomya gipofizov belykh kryс [Age-Dependent Structure of White Rats' Hypophysis]. *Morfologiya*, 2011, vol. 5, no. 3, pp. 41–45.

10. Goral's'kyj L.P., Homych V.T., Konons'kyj O.I. *Osnovy gistologichnoi' tekhniki i morfofunkcional'ni metody doslidzhennja u normi ta pry patologii'* [Fundamentals of Histologic Techniques and Morphological and Functional Research Methods in Health and Disease]. Zhytomyr, 2005. 288 p.

11. Merkulov G.A. *Kurs patologogistologicheskoy tekhniki* [A Course of Pathohistological Technology]. Leningrad, 1961. 423 p.

12. Ovcharenko V.V., Mavrych V.V. Komp'yuterna programa dlja morfometrychnyh doslidzhen' "Master of Morphology" [Computer Program for Morphometric Research "Master of Morphology"]. Patent no. 9604, 2004.

doi: 10.17238/issn2308-3174.2016.3.59

*Inessa V. Bobrysheva**

*Lugansk State Medical University (Lugansk, Ukraine)

PECULIARITIES OF THE STRUCTURE OF ACIDOPHILIC ENDOCRINE CELLS OF RAT ADENOHYPHYSIS AFTER APPLICATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Understanding cellular and tissue mechanisms underlying the reorganization of the adenohypophysis in immunosuppression is crucial for a correction, if needed, of the therapy of patients receiving cytostatic drugs for the treatment of autoimmune diseases and cancer, as well as for organ and tissue transplantation. The aim of this research was to study the structural reorganization of acidophilic endocrine cells of distal adenohypophysis in pubertal rats under experimental immunosuppression. The study was carried out on 60 white outbred pubertal male rats weighing 40–60 g. The immunosuppressive condition was modelled in the animals by administration of a cytostatic drug, cyclophosphamide. Morphometric parameters of acidophilic endocrine cells were evaluated in preparations stained with hematoxylin and eosin, Mallory's method, as well as in ultrathin sections. It was established that in the early period of observation after the administration of cytostatic drug the structural changes of acidophilic endocrine cells in the adenohypophysis indicate an increase in their functional activity (increased area of cells and their nuclei, decreased nuclear-cytoplasmic ratio, increased relative area of nucleoli and mitochondria, secretory granules and index of granule activity). On day 15 and 30 we observed expressed destructive and dystrophic changes in the nuclear and cytoplasmic structures of the endocrine cells, accompanied by a decrease in hormone production. Sixty days after the administration of cyclophosphamide, ultrastructural characteristics and morphometric parameters of the endocrine cells under study do not differ significantly from the control data. Thus, administration of cyclophosphamide to pubertal test animals causes an active response in their acidophilic endocrine cells of distal adenohypophysis, which is manifested in phasic morphological alterations and quantitative changes in morphometric parameters.

Keywords: rats, anterior pituitary, acidophilic endocrine cells, immunosuppression.

Поступила 12.05.2016

Received 12 May 2016

Corresponding author: Inessa Bobrysheva, address: 1 kvartal 50-letiya Oborony Luganska, Lugansk, 91045, Ukraine; e-mail: inessa_lug@mail.ru