



Биолог. журн. Армении, 1 (74), 2022

DOI:10.54503/0366-5119-2022.74.1-24

СРАВНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПОСЛЕ ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ АЛИМЕНТАРНОЙ ДЕПРИВАЦИИ

Р.В. ЯНКО

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины
biolag@ukr.net*

Целью данной работы было сравнение разных видов алиментарной депривации (АД) на морфологические изменения цитовидной железы (ЩЖ) крыс. Исследование проведено на 36 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 15 месяцев. Одна группа подопытных крыс была под воздействием интервальной (1 день полное голодание / 2 дня стандартный рацион питания), а другая – частичной (пищевой рацион, сниженный по массе на 30 % по сравнению с контролем) АД. Общая продолжительность эксперимента составила 28 дней. Доступ к воде был свободным. Гистологические препараты ЩЖ готовили по стандартной методике. Гистоморфометрию цифровых изображений препаратов проводили с помощью компьютерной программы “Image J”. Показано, что воздействие АД разных видов имело различные по характеру морфологические изменения ЩЖ. Однако выраженность изменений в паренхиме железы подопытных крыс после влияния интервальной АД проявлялась в большей степени, чем при частичном голодании. Изменения основных гистоморфометрических показателей ЩЖ крыс, после воздействия АД, указывают о наличии признаков повышения её активности. Об этом свидетельствовало возрастание массы железы, уменьшение площади фолликулов, коллоида, внутреннего диаметра фолликулов, индекса накопления коллоида и относительной площади стромы, а также увеличение высоты фолликулярного эпителия, фолликулярно-коллоидного индекса, стереологического индекса резорбции, количества интерфолликулярных островков.

Алиментарная депривация – цитовидная железа – морфологические исследования

Այս աշխատանքի նպատակն է համեմատել տարբեր տեսակների սննդային անբավարարության ազդեցությունն առնետների վահանաձև գեղձի (ТГ) ձևաբանական փոփոխությունների վրա: Յետազոտությունն իրականացվել է 15 ամսական 36 արու Wistar ցեղատեսակի գծային առնետների վրա: Փորձարարական առնետների մի խումբը ենթարկվել է ընդմիջումային (1 օր լիակատար սով / 2 օր ստանդարտ չափաբաժին), իսկ մյուսը՝ մասնակի (սննդի չափաբաժինը 30%-ով կրճատվել է ըստ բաշի՝ ստուգիչի համեմատ) սննդային անբավարարության: Փորձի ընդհանուր տևողությունը 28 օր էր: Ջրի մուտքն ազատ էր: Վահանաձև գեղձի հյուսվածքաբանական պատրաստուկները ենթարկվել են ստանդարտ մշակման: Պատրաստուկների թվային պատկերների հիստոմորֆոմետրիան կատարվել է Image J համակարգչային ծրագրի միջոցով: Ցույց է տրվել, որ տարբեր տեսակների սննդային անբավարարությունը հարուցել է վահանաձև գեղձի նմանատիպ ձևաբանական փոփոխություններ: Սակայն, փորձակենդանիների վահանաձև գեղձի պարենխիմային փոփոխություններն առավել արտահայտված էին ընդմիջումային կերակրման պայմաններում: Առնետների վահանաձև գեղձի հիմնական հյուսվածքային և ձևաչափական ցուցանիշների փոփոխությունները վկայում են դրա ակտիվության բարձրացման մասին: Դրա մասին են վկայում գեղձի զանգվածի ավելացումը, ֆոլիկուլների, կոլոիդի, ֆոլիկուլների ներքին տրամագծի նվազումը, կոլոիդի կուտակման և հենքի հարաբերական մակերեսի ինդեքսի, ինչպես նաև ֆոլիկուլային էպիթելի բարձրության, ֆոլիկուլակոլոիդային ինդեքսի, ռեզորբցիայի ստերեոլոգիական ինդեքսի, ներֆոլիկուլային կղզյակների քանակների մեծացումը:

Սննդի անբավարարություն – վահանաձև գեղձ – ձևաբանական ուսումնասիրություններ

The aim of this work was to compare different types of alimentary deprivation (AD) for morphological changes in the thyroid gland of rats. The study was carried out on 36 male Wistar rats at the age of 15 months. One group of experimental rats was exposed to interval (1 day complete fasting / 2 days standard diet), and the other – partial (food ration reduced in weight by 30 % compared to control) AD. The total duration of the experiment was 28 days. Access to water was free. Histological preparations of the thyroid gland were prepared according to the standard technique. Histomorphometry of digital images of preparations was performed using the computer program “Image J”. It was shown that the effect of different types of AD had morphological changes in the thyroid gland of the same type. However, the severity of changes in the gland parenchyma of experimental rats after the influence of interval AD was manifested to a greater extent than with partial AD. Changes in the main histo-morphometric parameters of the thyroid gland of rats, after exposure to AD, indicate the presence of signs of an increase in its activity. This was evidenced by an increase in the mass of the gland, a decrease in the area of follicles, colloid, inner diameter of follicles, the colloid accumulation index and the relative area of the connective tissue, as well as an increase in the height of the follicular epithelium, follicular-colloid index, stereological index of resorption, the number of interfollicular islets.

Alimentary deprivation – thyroid gland – morphological studies

Вопросы о механизмах действия голодания, а также оптимальных режимах его применения в оздоровительных и лечебных целях остаются в центре внимания исследователей до настоящего времени. Известно, что умеренное ограничение пищевого рациона оказывает положительный эффект на большинство процессов жизнедеятельности организма. В то время как длительное полное голодание или неполноценное питание, напротив, снижает адаптационные возможности организма и ускоряет наступление смерти. Установлено, что в основе положительного эффекта дозированного голодания лежат такие важные физиологические механизмы, как: аутолиз нежизнеспособных клеточных структур; активное освобождение организма от конечных продуктов обмена веществ, эндотоксинов, включая метаболиты лекарств, чужеродных антигенов; изменение состояния рецепторного аппарата клеток; повышение активности факторов неспецифической резистентности при одновременной стимуляции процессов регенерации [10]. Все это служит основой для широкого использования алиментарной депривации (АД) в медицинской практике для лечения и профилактики различных заболеваний [12, 16].

Но, несмотря на хорошо изученный эффект от АД на организм, литературные данные относительно его влияния на функциональную активность, и особенно на морфологические изменения в щитовидной железе (ЩЖ), часто имеют противоречивый характер [4, 14, 15, 17, 18]. Это может быть связано с использованием в экспериментах разных видов АД, длительностью проведения опытов и т.п. Все это требует более детального изучения роли и механизмов воздействия АД на ЩЖ.

Цель работы – исследовать и сравнить разные виды АД на морфологические изменения ЩЖ крыс.

Материал и методика. Исследование проведено на 36 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 15 месяцев. Крыс разделили на 3 группы (по 12 в каждой): I – контроль, II – крысы, которые подвергались интервальному голоданию, а именно: 1 день полное голодание / 2 дня стандартный (виварный) рацион питания (интервальная АД), III – животные, получавшие пищевой рацион, сниженный по массе на 30 % по сравнению с контролем (частичная АД). Суточный рацион питания для контрольной крысы составлял 20 г (65 ккал) специализированного комбикорма, а для крысы, получавшую частичную АД, – 14 г (45 ккал). Такую степень снижения калорийности рациона по классификации Мак Кея С.М. относят к “мягкой” АД, способной продлевать продолжительность жизни, повышать эффективность функционирования молекулярных и клеточных систем, увеличивать адаптационные возможности организма. Животные находились в унифицированных условиях на стандартном рационе

питания. Доступ к воде был свободным. Продолжительность эксперимента составляла 28 дней. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Исследования проводили согласно с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

После выделения ЩЖ определяли её массу. За тем, из центральных участков железы брали образцы ткани, из которых изготавливали гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм, изготавливали на санном микротоме, окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Для визуализации элементов соединительной ткани применяли метод окраски по Ван Гизону [11]. Микропрепараты фотографировали на микроскопе “Nikon Eclipse E100” (Япония), оснащённом цифровой камерой. Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы “Image J”.

На гистологических срезах ткани ЩЖ измеряли: площадь поперечного сечения фолликулов, коллоида и фолликулярного эпителия; внешний и внутренний диаметры фолликулов; высоту фолликулярного эпителия. Подсчитывали среднее количество тироцитов в фолликулах. Определяли фолликулярно-коллоидный индекс (отношение площади фолликулярного эпителия к площади коллоида), индекс накопления коллоида (отношение среднего внутреннего диаметра к двойной высоте тироидного эпителия), стереологический индекс резорбции ($4/h$, где h – средняя длина хорд отрезков линий, приходящихся на коллоид). С использованием метода наложения точечных морфометрических сеток вычисляли относительную площадь соединительной ткани, паренхимы железы, определяли стромально-паренхиматозный индекс. Измеряли ширину прослоек междольевой, междольковой и межфолликулярной соединительной ткани [2, 5].

Статистическую обработку осуществляли методами вариационной статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли по критерию Пирсона. При нормальности распределения для оценки достоверности разницы между контрольной и подопытной группой использовали t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Масса тела контрольных крыс за время эксперимента увеличилась на 5 %, а находившихся на АД животных, наоборот, уменьшилась, а именно: после влияния интервальной АД – на 12 % и после частичной АД – на 11 %. У подопытных крыс масса ЩЖ была достоверно большей от контрольных значений на 24 % (интервальная АД) и 18 % (частичная АД) (табл. 1). Гипертрофия железы может свидетельствовать об возрастании активности органа.

Таблица 1. Масса тела и щитовидной железы, г ($M \pm m$; $n = 12$)

Показатели	Контроль	Интервальная алиментарная депривация	Частичная алиментарная депривация
Масса тела в начале эксперимента	410,7±7,1	425,0±13,0	415,6±12,3
в конце эксперимента	430,7±9,2	375,0±10,1	368,8±10,4
Масса щитовидной железы	0,017±0,001	0,021±0,001*	0,02±0,012*

Примечание: * $p < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

ЩЖ крыс, после воздействия разных видов АД, сохраняла физиологическую структуру с четким распределением на центральную и периферическую зоны. Фолликулы железы были разной величины, имели круглую или овальную форму. Коллоид фолликулов контрольных животных был умеренной плотности и содержал небольшое количество резорбционных вакуолей. Коллоид фолликулов ЩЖ подопытных животных был умеренной плотности, но также часто имел и "пенистый" характер из-за наличия многочисленных вакуолей (рис. 1).

В ЩЖ крыс, после воздействия как интервальной, так и частичной АД наблюдали меньшую площадь поперечного сечения фолликулов на 10 % и 15 % ($p < 0,05$) соответственно, чем в контроле. Площадь коллоида в фолликулах подопытных крыс была достоверно меньшей на 18 %.

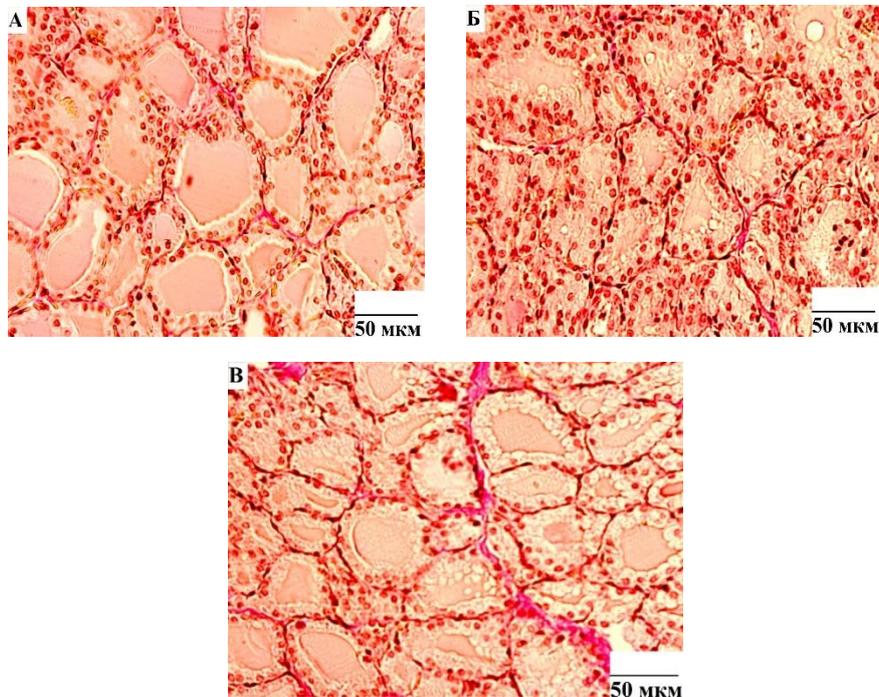


Рис. 1. Микрофотографии щитовидной железы контрольной крысы (А) и крысы после воздействия интервальной (Б) и частичной (В) алиментарной депривации. Окраска по методу Ван Гизон. Увеличение 400.

Внутренний диаметр фолликулов подопытных животных также был достоверно меньшим на 15 % (интервальная АД) и 13 % (частичная АД), чем в контроле. Тиреоциты часто имели призматическую форму, а высота их после интервальной АД была на 11 % ($p < 0,05$) больше контроля (табл. 2). Это может свидетельствовать о повышении активности железы, активной резорбции тиреоглобулина и секреции гормонов в кровеносное русло [3].

В ЩЖ крыс, после влияния интервальной и частичной АД, выявлено достоверное увеличение стереологического индекса резорбции на 18 % и 14 % соответственно. Этот показатель характеризует динамику накопления и выведения интрафолликулярного коллоида. В то время как индекс накопления коллоида, наоборот, был достоверно меньше на 23 % (интервальная АД) и 13 % (частичная АД). Фолликулярно-коллоидный индекс в ЩЖ животных, получавших интервальную АД, возрос на 16 % ($p < 0,05$), а после влияния частичной АД – оставался близок к контрольным значениям (табл. 2). Рост стереологического индекса резорбции, фолликулярно-коллоидного индекса и понижение индекса накопления коллоида свидетельствует об усилении секреции тиреоидных гормонов в кровеносное русло [9].

У крыс, находившихся на АД, наблюдали тенденцию к увеличению количества интерфолликулярных островков, что можно рассматривать как признак активации процессов фолликулогенеза (регенерации) ЩЖ. Установлено, что ин-

терфолликулярные островки содержат малодифференцированные клетки, которые могут являться источником для формирования новых фолликулов [6].

Таблица 2. Морфометрические показатели щитовидной железы ($M \pm m$; $n = 12$)

Показатели	Контроль	Интервальная алиментарная депривация	Частичная алиментарная депривация
Паренхима			
Относительная площадь, %	68,4±1,5	73,6±1,5	74,4±2,2
Площадь, мкм ² :			
фолликула	2915±42	2621±107	2490±38*
коллоида	1247±35	1027±27*	1020±22*
фолликулярного эпителия	1668±60	1594±54	1470±42*
Диаметр фолликула, мкм			
внешний	57±1,1	54,1±1,8	52,7±1,9
внутренний	35,9±1,1	30,6±1,1*	31,4±1,2*
эффективный	67,6±1,2	65,9±2,2	63,4±1,9
Высота тиреоцитов, мкм	10,6±0,1	11,8±0,1*	10,7±0,3
Количество тиреоцитов в фолликуле, шт	23,9±0,5	22,1±0,8	22,2±1,0
Фолликулярно-коллоидный индекс	1,34±0,11	1,55±0,08*	1,44±0,14
Индекс накопления коллоида	1,69±0,05	1,30±0,05*	1,47±0,01*
Стереологический индекс резорбции	0,111±0,003	0,131±0,004*	0,127±0,002*
Соединительная ткань			
Относительная площадь, %	31,6±1,6	26,4±1,1*	25,6±1,3*
Стромально-паренхиматозный индекс	0,46±0,04	0,36±0,03*	0,34±0,04*
Ширина прослоек соединительной ткани, мкм			
междольковой	24,5±0,9	21,5±0,8*	23,9±1,0
междольковой	10,8±0,4	9,2±0,4*	11,1±0,6
межфолликулярной	2,30±0,12	1,38±0,10*	1,51±0,10*

Примечание: * - $p < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

В ЩЖ подопытных крыс выявлено существенное снижение относительной площади стромы и стромально-паренхиматозного индекса. Так, в железе животных, после воздействия интервальной АД эти показатели достоверно снизились на 16 % и 22 % соответственно, сравнительно с контролем. У крыс, находившихся на частичной АД, относительная площадь соединительной ткани в железе была достоверно ниже контрольных значений на 19 %, а показатель стромально-паренхиматозного индекса был меньшим на 26 %. Также у животных, после воздействия интервальной АД, наблюдали достоверное снижение ширины прослоек междольковой (на 12 %), междольковой (на 15 %) и межфолликулярной (на 40 %) соединительной ткани, по сравнению с контролем. В железе крыс, находившихся на частичной АД, достоверно снизилась лишь межфолликулярная соединительная ткань на 34 % (табл. 2). Уменьшение относительной площади стромы и, соответственно, увеличение относительной доли паренхиматозных элементов в железе может рассматриваться как один из признаков активации ее функции и повышение регенераторных возможностей. Очевидно, что уменьшение ширины прослоек и массы соединительной ткани ЩЖ в целом улучшает межфолликулярный обмен веществ и проникновение гормонов в кровь.

Литературные данные, посвященные влиянию АД на ЩЖ, единичны, а имеющиеся результаты носят неоднозначный характер. Преимущественно исследовали концентрацию тиреоидных гормонов в крови людей и животных, получавших пониженный рацион питания по калорийности. Обнаружено, что ограничение питания по-разному влияет на концентрацию тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс. Так, у животных, получавших сниженный рацион питания, заметили, что концентрация тироксина (Т4) в сыворотке крови не изменилась, концентрация трийодтиронина (Т3) – снизилась, а обратного Т3, напротив, возросла [13]. Другие учёные обнаружили снижение всех гормонов ЩЖ в крови после воздействия ограниченного питания [8, 14, 17]. В то время как некоторые исследователи наблюдали, что после воздействия месячной низкокалорийной диеты концентрация Т3 и Т4 в крови существенно возрастает, а концентрация тиреотропного гормона, напротив, снижается [15].

Морфологические изменения в ЩЖ, после воздействия ограниченного питания, наблюдали и другие исследователи. Так, после интервального голодания (1 день полное голодание / 1 день стандартный рацион) в течение месяца у крыс выявлено наличие пустых фолликулов и периферических вакуолей, что считается признаком гиперактивности железы [7]. В другом исследовании, проведенном на крысах линии Wistar всех возрастов, показано, что после окончания периода полного голодания в ЩЖ наблюдаются морфологические признаки повышения функциональной активности тиреоцитов и усиления активности микроциркуляторного русла. С увеличением сроков голодания эти изменения нарастают, а затем сменяются признаками угнетения функции ЩЖ [1].

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что крысы, находившиеся в течение 28 суток под воздействием АД разных видов, имели однотипные по характеру морфологические изменения ЩЖ. Однако выраженность изменений в паренхиме железы подопытных крыс после влияния интервального голодания (1 день полное голодание / 2 дня стандартный рацион) проявлялась в большей степени, чем при постоянном ограниченном питании на 30 %. Изменения основных гисто-морфометрических показателей ЩЖ крыс, после воздействия АД, указывает о наличии признаков повышения её активности. Об этом свидетельствовало возрастание массы железы, уменьшение площади фолликулов, коллоида, внутреннего диаметра фолликулов, индекса накопления коллоида и относительной площади стромы, а также увеличение высоты фолликулярного эпителия, фолликулярно-коллоидного индекса, стереологического индекса резорбции, количества интерфолликулярных островков. Таким образом, дозированное ограничение калорийности пищевого рациона вызывало реципрокные изменения морфофункциональных показателей, характеризующих функциональную и регенераторную активность паренхиматозных элементов ЩЖ и её соединительнотканых элементов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мгалобичвили З.Г.* Изменение структуры щитовидной железы у 24-месячных крыс при голодании. Сакартвелос самедицино моамбе, 1, 65-6, 1992.
2. *Никишин Д.В.* Морфология и методы исследования щитовидной железы: Методические рекомендации. Пенза. Инф.-изд. центр ПГУ, 64 с., 2008.
3. *Юлдашева Ф.З., Юлдашев А.Ю., Исмаилов С.И., Рашитов М.М.* Ультроструктурная характеристика тиреоцитов при гипо- и гиперфункции щитовидной железы. Клиническая тиреодология, 35, 3, 132-35, 2011.
4. *Янко Р.В.* Морфологические изменения щитовидной железы крыс после интервального голодания. Эндокринология, 25, 2, 137-142, 2020. doi: 10.31793/1680-1466.2020.25-2.137

5. Янко Р.В. Сезонные различия сочетанного воздействия интервальной нормобарической гипоксии и мелатонина на морфофункциональное состояние щитовидной железы гипертензивных крыс. Биолог. журн. Армении, 72, 4, 32-9, 2020
6. Aleshin B.V., Brindak O.I., Mamina V.V. Correlations between the functional activity and proliferation of the thyroid parenchyma. The proliferative forms of the parenchyma of the thyroid. Probl Endokrinol (Mosk), 33, 6, 67-72, 1987.
7. Fetoui H., Bouaziz H., Mahjoubi-Samet A., Soussia L., Guermazi F., Zeghal N. Food restriction induced thyroid changes and their reversal after refeeding in female rats and their pups. Acta Biol Hung., 57, 4, 391-402, 2006.
8. Lachowicz K., E. Fuerstenberg, E. Palkowska, Stachoń M., Gajewska D., Myszkowska-Ryciak J., Kozłowska L., Ciecierska A., Rosołowska-Huszcz D. The effects of caloric restriction and age on thyroid hormone signalling in the heart of rats . Journal of Animal and Feed Sciences, 23, 97-104, 2014.
9. Lee J., Yi S., Kang Y. E., Kim H. W., Joung KH, Sul HJ, Kim KS, Shong M. Morphological and functional changes in the thyroid follicles of the aged murine and humans. J Pathol Transl Med., 50, 6, 426-35, 2016.
10. Longo V.D., Mattson M.P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. Cell Metab., 19, 2, 181-92, 2014. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008.
11. Malatesta M. Histological and histochemical methods – Theory and practice. Eur J Histochem., 60, 1, 2639, 2016. doi: 10.4081/ejh.2016.2639.
12. Mattson M., Allison D., Fontana , Harvie M., Longo V., Malaisse W., Mosley M., Notterpek L., Ravussin E., Scheer F. A., Seyfried T. N., Varady K. A., Panda S.. Meal frequency and timing in health and disease. Proc Natl Acad Sci USA, 111, 47, 16647–53, 2014. doi: 10.1073/pnas.1413965111.
13. Moreira-Andres M.N., Black E.G., Ramsden D.V., Hoffenberg R. The effect of calorie restriction on serum thyroid hormone binding proteins and free hormone in obese patients. Clin Endocrinol (Oxf), 12, 3, 249-55, 1980.
14. Roth G.S., Handy A.M., Mattison J.A., Tilmont E.M., Ingram D.K., Lane M.A. Effects of dietary caloric restriction and aging on thyroid hormones of rhesus monkeys. Horm Metab Res., 34, 378-82, 2002.
15. Sultan S., Rashed L. Effect of low calorie diet and exercise on thyroid hormones and leptin levels. Med. J. Cairo Univ., 77, 1, 33-9, 2009.
16. Weiss E.P., Fontana L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 301, 4, H1205–H1219, 2011. doi: 10.1152/ajpheart.00685.2011.
17. Weiss E.P., Villareal D.T., Racette S.B., Steger-May K, Premachandra B.N., Klein S., Fontana L. Caloric restriction but not exercise-induced reductions in fat mass decrease plasma triiodothyronine concentrations: a randomized controlled trial. Rejuvenation research, 11, 3, 605-9, 2008. doi:10.1089/rej.2007.0622.
18. Yanko R.V., Levashov M.I. Effect of interval fasting on morphological changes in the rat thyroid gland of different age. Biological sciences of Kazakhstan, 1, 8-18, 2021. doi: 10.52301/1684-940X-2021-1-8-18.

Поступила 29.12.2021