

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

Л.В. Бабийчук^{1*}, В.П. Невзоров², О.Ф. Невзорова², В.Г. Бабийчук¹

Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс в условиях неврогенной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

L.V. Babiychuk^{1*}, V.P. Nevzorov², O.F. Nevzorova², V.G. Babiychuk¹

Ultrastructure of Thyrocytes in Young Rats at Neurogenic Arterial Hypertension and Following Administration of Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells

Реферат: Для обоснования целесообразности применения препаратов кордовой крови в терапии неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии нами проведены электронно-микроскопические исследования изменений ультраструктуры органелл тиреоцитов молодых крыс с гипертензией до и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови. Исследование субмикроскопической организации тиреоцитов щитовидной железы показало наличие дистрофических нарушений органелл, степень выраженности которых варьировала в зависимости от сроков развития данной патологии. Установлено, что через месяц после введения криоконсервированного препарата ядросодержащих клеток кордовой крови субмикроскопическая архитектура тиреоцитов крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией приобретала нормальное строение.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, щитовидная железа, тиреоциты, ультраструктура, митохондрии, ядро-содержащие клетки кордовой крови.

Реферат: Для обґрунтування доцільності застосування препаратів кордової крові в терапії неврогенної стрес-індукованої артеріальної гіпертензії нами були проведені електронно-мікроскопічні дослідження змін в ультраструктурі органелл тиреоцитів молодих щурів з гіпертензією до і після введення криоконсервованих ядерних клітин кордової крові. Дослідження субмікроскопічної організації тиреоцитів показало наявність дистрофічних змін органелл, ступінь прояву яких варіював у залежності від термінів розвитку даної патології. Встановлено, що через місяць після введення криоконсервованого препарату ядерних клітин кордової крові субмікроскопічна архітектура тиреоцитів щурів з неврогенною стрес-індукованою артеріальною гіпертензією набувала нормальної будови.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, щитоподібна залоза, тиреоцити, ультраструктура, мітохондрії, ядровмісні клітини кордової крові.

Abstract: In order to justify the expediency of application of cord blood preparations in therapy of neurogenic stress-induced arterial hypertension we carried out an electron-microscopic study of changes in ultrastructure of thyrocyte organelles in young rats with arterial hypertension prior to and after introduction of cryopreserved cord blood nucleated cells. The study of submicroscopic organization of thyrocytes demonstrated the presence of dystrophic changes in organelles, manifestation degree of which varied depending on the pathology development term. Submicroscopic architecture of thyrocytes in rats with stress-induced neurogenic arterial hypertension was established as acquired the normal structure one month later introduction of cryopreserved preparation of cord blood nucleated cells.

Key words: arterial hypertension, thyroid gland, thyrocytes, ultrastructure, mitochondria, cord blood nucleated cells.

Артериальная гипертензия (АГ) является одним из основных факторов риска развития кардио-и цереброваскулярной патологии. Распространенность АГ в мире очень высока: более 50% людей старше 60 лет страдают этим заболеванием. К числу основных причин, способствующих развитию заболевания, относятся наследственность и факторы риска, среди которых следует отдельно выделить эмоциональный стресс [3].

Arterial hypertension (AH) is one of the major risk factors for cardiovascular and cerebrovascular pathologies. Hypertension is very distributed worldwide: more than 50% of people over age 60 suffer from this disease. To the main reasons contributing to the development of the disease are heredity and risk factors, among which emotional stress should be emphasized [3].

Relationship between cardiovascular system state and structural changes of thyroid gland on the back-

¹Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Лаборатория патоморфологии и экспериментальной хирургии, ГУ «Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины», г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: babiichuk.lyudmila@mail.ru

Поступила 29.10.2013

Принята в печать 19.11.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 309–317. © 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Laboratory of Pathomorphology and Experimental Surgery, Institute of General and Urgent Surgery, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: babiichuk.lyudmila@mail.ru

Received October, 29, 2013

Accepted November, 19, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 309–317. © 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Связь между состоянием сердечно-сосудистой системы и структурными изменениями щитовидной железы на фоне неврогенного стресса изучается давно. Механизмы влияния тиреоидных гормонов (ТГ) на сердечно-сосудистую систему включают: 1) действие ТГ на уровне генома; 2) негеномное, прямое влияние ТГ на миокард, включающее воздействие на мембраны, саркоплазматический ретикулум и митохондрии; 3) воздействие ТГ на периферическую циркуляцию [5].

В публикациях недавнего времени имеются многочисленные данные о влиянии хронического стресса на гистофизиологию щитовидной железы. Показано, что моделирование хронического эмоционального стресса вызывало гипертрофию и гиперплазию фолликулов щитовидной железы у экспериментальных животных в раннем постнатальном онтогенезе [2]. Несмотря на большое количество гипотензивных препаратов, лишь у одной трети пациентов, которым проводится лечение, отмечается нормализация артериального давления (АД). Альтернативным терапевтическим подходом для данной категории больных может служить клеточная терапия. Кордовая кровь является важным источником трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток для взрослых и детей, страдающих различного рода заболеваниями [1]. Недавно опубликованные результаты научных исследований создают предпосылки для успешного применения компонентов кордовой крови в лечении целого ряда гематологических, онкологических, неврологических и кардиологических заболеваний [4, 11–14]. Изучение механизмов действия препаратов, полученных из кордовой крови, на некоторые патогенетические звенья развития неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии поможет обосновать целесообразность применения препаратов в терапии данного заболевания.

В связи с выше изложенным, целью данной работы являлась оценка изменений в ультраструктуре органелл тиреоцитов молодых крыс в процессе развития неврогенной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека (ЯСК КК).

Материалы и методы

Исследования проводили на молодых белых беспородных половозрелых крысах-самцах (возраст 6 месяцев). Все животные были разделены на три группы (по 7 крыс в каждой): первая – контрольные (интактные) крысы; вторая – животные со стресс-индуцированной АГ; третья – животные с АГ, которым были введены криоконсервированные ЯСК КК. Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, Украина,

ground of neurogenic stress has been studied for a long time. Mechanisms of effect of thyroid hormones (TH) on cardiovascular system include: 1) the effect of TH on genome level; 2) nongenomic, direct effect of TH on myocardium, including membranes, sarcoplasmic reticulum and mitochondria; and 3) the impact of TH on peripheral circulation [5]. Recently reported data associate chronic stress and thyroid gland histophysiology. Modeling of chronic emotional stress has been shown to cause a hypertrophy and hyperplasia of thyroid follicles in experimental animals at early postnatal ontogenesis [2]. Despite a large number of anti-hypertensive drugs, only in one-third of patients undergoing the treatment the normalization of blood pressure (BP) occurs. Cell therapy may serve as an alternative therapeutic approach for these patients. Cord blood is an important source of grafts with hemopoietic stem cells for adults and children, suffering from different diseases [1]. Recently reported investigations provide the prerequisites for successful use of cord blood components when treating a variety of hematological and oncological, neurological and cardiac diseases [4, 11–14]. The study of the mechanisms of effect provided by cord blood preparations on some pathogenetic links of the development of stress-induced neurogenic hypertension could reveal the usability of these preparations in treatment of AH.

In connection with the above stated, the aim of this study was to assess the changes in ultrastructure of thyrocyte organelles of young rats during progression of neurogenic arterial hypertension and following the introduction of cryopreserved cord blood nucleated cells (CBNC).

Materials and methods

The investigations were carried-out in young mature outbred white male rats (6-month-old). All the animals were divided into three groups (7 rats in each): the first group comprised the control (intact) rats; second group consisted of the animals with stress-induced AH; in the third group there were the animals with AH, treated with cryopreserved CBNC. The experiments in animals were carried-out in compliance with the 'General Principles of Experiments in Animals' approved by the 1st National Congress in Bioethics (Kiev, Ukraine, 2001) and agreed with the statements of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, France, 1986).

Neurogenic stress-induced hypertension was simulated by the method of I. Shosh [8] in our modification [10], until getting a stable increased blood pressure levels $((168.54 \pm 12.24)/(81.16 \pm 2.6) \text{ mm Hg})$ using combined periodic effects on animals with light, sound, electrical stimuli.

The animals with stress-induced hypertension were injected with preparation of human cryopreserved cord



2001) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (г. Страсбург, Франция, 1986).

Неврогенную стресс-индуцированную артериальную гипертензию моделировали по методу Й. Шош [8] в нашей модификации [10] до получения стойких повышенных цифр артериального давления ((168,54 ± 12,24)/(81,16 ± 2,6) мм рт. ст) путем комплексного периодического воздействия на организм животных различными видами раздражителей: светового, звукового, электрического.

Животным со стресс-индуцированной АГ вводили криоконсервированный препарат кордовой крови человека, полученный в ИПКиК НАН Украины [9]. Препарат представлял собой взвесь криоконсервированных ЯСК КК в аутоплазме с концентрацией CD34⁺-клеток (2–4)×10⁵ в 1 мл. Выделение фракции ядросодержащих клеток из кордовой крови проводили методом седиментации в растворе декстрана Д-60. При криоконсервировании в качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Содержание клеток с фенотипом CD45⁺, CD45⁺CD34⁺, а также их жизнеспособность (CD45⁺7AAD⁻, CD34⁺7AAD⁻) определяли с помощью проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с использованием реагентов производства «BD» (США) по протоколу Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering, ISHAGE).

Размороженный препарат вводили внутривенно однократно в дозе 1×10⁵ CD34⁺-клеток на килограмм массы животного на 7-е сутки после развития гипертензии.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации на 3-, 7- и 30-е сутки после развития стойкой АГ и введения препарата ЯСК КК, производили забор кусочков ткани щитовидной железы для электронно-микроскопического исследования.

Кусочки щитовидной железы измельчали в капле охлажденного глютарово-формальдегидного раствора и переносили в 1 мл того же раствора на 5–6 ч для предварительной фиксации. Затем материал промывали и переносили в забуференный раствор 1% четырехоксида осмия на 3–4 ч при температуре 4°C для окончательной фиксации. Ткань обезвоживали в спиртовых растворах возрастающей концентрации и ацетоне, пропитывали смесью эпоксидных смол (эпон-аралдит) и заключали в блоки, полимеризацию которых проводили в термостате при 60°C в течение двух суток. Из блоков на ультрамикротоме УМТП-ЗМ получали ультратонкие срезы, монтировали их на электролитические сеточки, контрастировали цитратом свин-

blood obtained at IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine [9]. The preparation was a suspension of cryopreserved in autoplasm CBNCs with CD34⁺ cells concentration of 2–4×10⁵ in 1 ml. Fraction of NC was isolated from CB by sedimentation in dextran D-60 solution. During cryopreservation DMSO was used as cryoprotectant in 5% final concentration. Content of cells with phenotype of CD45⁺, CD45⁺CD34⁺, as well as their viability (CD45⁺7AAD⁻, CD34⁺7AAD⁻) were determined using flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), BD reagents and according to the protocol of ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering).

Frozen-thawed preparation was intraperitoneally administered in a dose of 1×10⁵ CD34⁺ cells per kilogram of animal weight, one-fold, on the day 7 after the hypertension development.

The animals were sacrificed on the 3rd, 7th and 30th days after the development of stable hypertension and administration of CBNC preparation, the samples of thyroid tissue were procured for electron microscopic examination.

Thyroid samples were disintegrated in a drop of the cooled glutaric formaldehyde solution and transferred to 1 ml of the same solution for 5–6 hours for pre-fixation. Then the samples were washed and transferred for final fixation to a buffered solution of 1% osmium tetroxide for 3–4 hours at 4°C. Tissue was then dehydrated in alcohol solutions of increasing concentration and acetone, the mixture was impregnated with epoxy resins (epon-araldite) and embedded into the blocks. Polymerization of blocks was carried-out in thermostat at 60°C during two days. Ultrathin sections were made from these blocks using ultramicrotome UMTP-ZM, mounted on electrolytic grid, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and thereafter studied under an electron microscope EMV-100 BR at an accelerating voltage of 75 kV.

Tissue of thyroid gland of intact young rats served as the control.

Results and discussion

Electron microscopic study of organelles of thyrocytes of young intact rats has shown that ultrastructural organization of these cells was characteristic for the normal animals of this age.

To the third day after the development of stable hypertension there were revealed moderately pronounced changes in organelles which were characteristic to the increase in intracellular metabolism activity. The degree of these changes was within the physiological compensation limits. Nuclear membrane had numerous deep invaginations. Chromatin was in a decondensed state (its granules were diffusely scattered throughout the nucleus matrix) and kept clearly contours. In some thyrocytes a focal loosening of the nuclear membrane



ца и уранилацетатом, затем изучали под электронным микроскопом ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Контролем служили кусочки ткани щитовидной железы молодых интактных крыс.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование органелл тиреоцитов молодых интактных крыс показало, что ультраструктурная организация этих клеток находилась в пределах возрастных особенностей.

На 3-и сутки после развития стойкой АГ выявлены умеренно выраженные изменения органелл, характерные для повышения активности внутриклеточного метаболизма. Степень этих изменений была в пределах физиологической компенсации. Ядерная мембрана имела многочисленные глубокие инвагинации. Хроматин находился в деконденсированном состоянии (его гранулы были диффузно рассеяны по матриксу ядра) и сохранял четкие контуры. В отдельных тиреоцитах наблюдалось очаговое разрыхление ядерной мембраны. Снижалась электронная плотность матрикса ядра. В сравнении с контрольными препаратами в образцах, полученных от животных с АГ, митохондрии имели больший размер и выглядели набухшими. Матрикс митохондрий обладал низкой электронной плотностью. Количество крист было меньшим, чем в контрольных препаратах (рис. 1). Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены и заполнены электронно-прозрачным веществом. На мембранах наблюдали множество рибосом. Присутствовали мелкие очаги разрыхления мембран эндоплазматического ретикулума. В цитоплазме тиреоцитов находилось большое количество секреторных гранул, заполненных плотным осмиофильным веществом. Гладкие мембраны пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи окружены множеством мелких электронно-прозрачных везикул и имели нормальную параллельную ориентацию. Количество рибосом и полисом в цитоплазме было выше в сравнении с контролем. Цитоплазматическая мембрана, обращенная в просвет фолликула, выглядела гладкой и имела единичные микроворсинки.

На 7-е сутки после развития стресс-индуцированной неврогенной АГ у молодых крыс в клетках щитовидной железы наблюдались полиморфные изменения ультраструктуры. Часть тиреоцитов имела ядра с визуальной четкой ядерной мембраной, отмечалось небольшое количество неглубоких инвагинаций. Большая часть ядерного хроматина деконденсирована, его гранулы находились в центральной области матрикса. Ширина перинуклеарного пространства была постоянной. Количество рибо-

was observed. Electron density of nucleus matrix was reduced. In comparison with the control group sections the samples from the animals with hypertension the mitochondria were bigger and looked swollen. Mitochondrial matrix was of a low electron density. The number of cristae was reduced comparing to the control (Fig. 1). Cisterns of granular endoplasmic reticulum were expanded and filled with electron-transparent substance. Many ribosomes were present on membranes. We observed small foci of loosening of endoplasmic reticulum membranes. Numerous secretory granules filled with dense osmiophil substance were found in cytoplasm of thyrocytes. Smooth membranes of laminar cytoplasmic Golgi complex were surrounded by a great number of small electron-transparent vesicles, the membranes kept their normal parallel orientation. In cytoplasm there was noted an increased amount of ribosomes and polysomes. Cytoplasmic membrane facing the lumen of the follicle was smooth and had single microvilli.

To the 7th day following development of stress-induced neurogenic AH in young rats, the cells of thyroid gland had polymorphous changes of ultrastructure. Some thyrocytes had the nuclei with visually distinct nuclear membrane, a few non-deep invaginations were present. The most part of nuclear chromatin was decondensed, its granules were in a central region of the nuclear matrix. Perinuclear spaces were constant along the whole section. The number of ribosomes and polysomes in the cytoplasm did not change if compared with previous observation term (3 days after AH development). Cisterns of granular endoplasmic reticulum

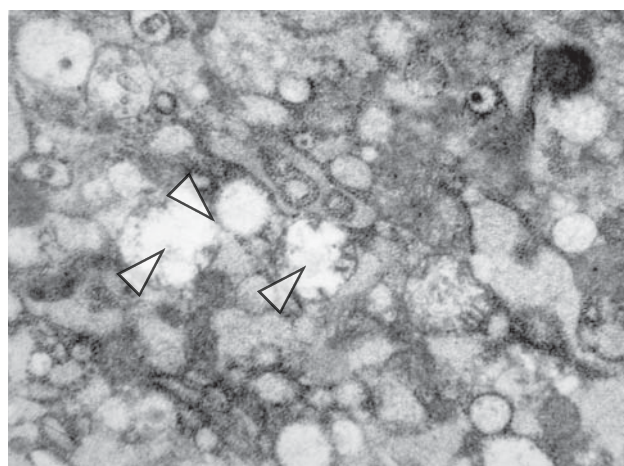


Рис. 1. Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс на 3-и сутки после развития АГ. Просветление матрикса и набухание митохондрий, очаги лизиса и разрыхления наружных мембран и крист (стрелки). $\times 36000$.

Fig. 1. Ultrastructure of thyrocytes of young rats to the 3rd day after AH development. Matrix lightening and mitochondria swelling, lysis foci and loosening of outer membranes and cristae (arrows). $\times 36,000$.



сом и полисом в цитоплазме не изменялось по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (3-е сутки после развития АГ). Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены по сравнению с контролем, на его мембранах наблюдалось большое количество рибосом. Многочисленные митохондрии содержали мелкозернистый матрикс средней электронной плотности и много коротких крист. Присутствовали также митохондрии с разрыхленными кристами. В некоторых тиреоцитах наблюдали делящиеся митохондрии, гиперплазию мембран гранулярной эндоплазматической сети. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи несколько гипертрофирован, его гладкие мембраны параллельно ориентированы.

Некоторые тиреоциты в препаратах, полученных на 7-е сутки после развития АГ, имели дистрофические и деструктивные изменения. Их ядра содержали в основном конденсированный хроматин. В ядерной мембране наблюдали очаговые разрыхления. На мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума локализовалось небольшое количество рибосом. Митохондрии были набухшие, их матрикс – электронно-прозрачным. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи редуцирован, вблизи его дезорганизованных гладких мембран обнаруживались вторичные лизосомы. В цитоплазме тиреоцитов располагались внутрицитоплазматические гранулы, содержащие коллоид (рис. 2). Апикальная часть цитоплазматической мембраны образовывала многочисленные микроворсинки, некоторые из них были набухшими. Цитоплазматическая мембрана выглядела разрыхленной.

На 30-е сутки после развития АГ у молодых крыс наблюдались дистрофические нарушения ультраструктуры тиреоцитов, ядра которых сохраняли типичную форму и локализацию в цитоплазме. Ядерная мембрана выглядела разрыхленной, имела мелкие инвагинации, хроматин находился преимущественно в конденсированном состоянии. Электронная плотность матрикса центральной области ядра была низкой. Деконденсированный хроматин располагался в виде отдельных гранул. Цитоплазма содержала коллоидные гранулы. Отмечены участки разрыхления мембран гранулярной эндоплазматической сети и расширение его цистерн. Количество связанных с мембранами рибосом было меньше, чем в контрольных препаратах. Снижалось и число свободно лежащих в цитоплазме рибосом и полисом. Толщина цитоплазматической мембраны тиреоцитов была больше, чем в контрольных препаратах. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи редуцирован и представлен группой хаотично ориентированных гладких мембран. В области его локализации обнаружены вторичные лизосомы. Митохондрии имели

were expanded if compared with the control, numerous ribosomes were observed on its membranes. Numerous mitochondria contained finely grained matrix of medium electron density and lots of short cristae. There were found also mitochondria with loosened cristae. In some thyrocytes we found the dividing mitochondria and granular endoplasmic reticulum with hyperplastic membranes. Laminar cytoplasmic Golgi complex was insignificantly hypertrophied, its smooth membranes had parallel orientation.

Some thyrocytes in the sections obtained on the 7th day following AH development had dystrophic and destructive disorders. Nuclei contained mostly condensed chromatin. Nuclear membrane was focally loosened. Membranes surfaces of granular endoplasmic reticulum contained small amount of ribosomes. Mitochondria were swollen, their matrix was electron transparent. Laminar cytoplasmic Golgi complex was reduced, near its disorganized smooth membranes we observed secondary lysosomes. Thyrocyte cytoplasm comprised granules with colloid (Fig. 2). Apical part of cytoplasmic membrane formed numerous microvilli, some of them were swollen. Cytoplasmic membrane was loosened.

On the 30th day following development of hypertension in young rats we found dystrophic disorders in thyrocyte ultrastructure. Nuclei of thyrocytes kept a typical shape and localization in cytoplasm. Nuclear membrane was loosened and had small invaginations. Nuclear chromatin was predominantly in a condensed state. Electron density of matrix in central region of the nucleus was decreased. Decondensed chromatin was represented by separate granules. Cytoplasm contained colloid granules. Few sites of membrane loosen-

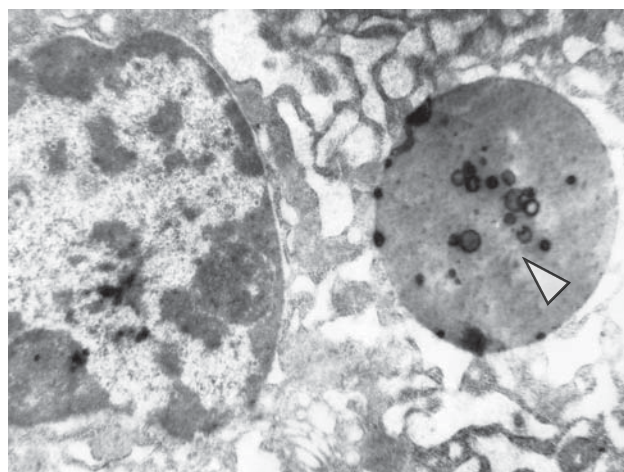


Рис. 2. Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс на 7-е сутки после развития АГ. Стрелка указывает на внутрицитоплазматические коллоидные гранулы. $\times 36000$.

Fig. 2. Ultrastructure of thyrocytes of young rats to the 7th day after hypertension development. Arrow points to intracytoplasmic colloid granules. $\times 36,000$.

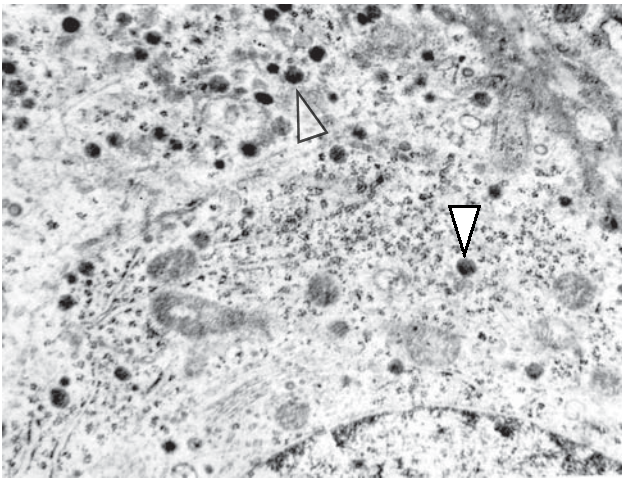


Рис. 3. Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы молодых крыс на 30-е сутки после развития АГ. Стрелками указаны секреторные гранулы в цитоплазме. $\times 38000$.

Fig. 3. Ultrastructure of thyrocytes of young rats to the 30th day after hypertension development. The secretory granules are in cytoplasm. $\times 38,000$.

разные размеры и форму, их количество снижалось. Матрикс митохондрий имел низкую электронную плотность. Кристы дезорганизованы. В цитоплазме некоторых тиреоцитов располагались мелкие секреторные гранулы, заполненные субстанцией различной электронной плотности (рис. 3).

В группе экспериментальных животных со стойкой стресс-индуцированной АГ на 3-е сутки после введения криоконсервированного препарата ЯСК КК в тиреоцитах молодых крыс, как и в группе животных с АГ, наблюдали дистрофические нарушения оргanelл.

Ядерная мембрана у большинства тиреоцитов имела чёткие контуры и глубокие инвагинации (рис. 4). Лишь у небольшого количества тиреоцитов ядерная мембрана имела участки разрыхления. На периферии матрикса ядра находился конденсированный хроматин, плотным кольцом охватывавший нуклеоплазму. В центре матрикса располагались равномерно рассеянные гранулы деконденсированного хроматина. В цитоплазме наблюдалось небольшое количество дистрофически изменённых митохондрий, матрикс которых имел среднюю электронную плотность и гомогенную структуру. Кристы митохондрий разрыхлены. Выявлены внутрицитоплазматические коллоидные гранулы. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи редуцирован, в области его локализации присутствовали включения липидов и вторичные лизосомы. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума вакуолизированы. На его мембранах наблюдали немногочисленные рибосомы. В цитоплазме тиреоцитов обнаружено

ing were found in granular endoplasmic reticulum as well as extended cisterns. Amount of membrane-bound ribosomes was significantly decreased if compared with the control. The number of free lying ribosomes and polysomes in the cytoplasm was also decreased. Thickness of thyrocyte cytoplasmic membrane was bigger than in the control. Laminar cytoplasmic Golgi complex was reduced and represented by the group of randomly oriented smooth membranes. It was surrounded by secondary lysosomes. The mitochondria were of various size and shape, their number was decreased. Mitochondrial matrix was of low electron density. Cristae were disorganized. Cytoplasm of some small thyrocytes had secretory granules filled with the substance of various electron density (Fig. 3).

In the group of experimental animals with stable stress-induced hypertension to the day 3 after injection of cryopreserved preparation of CBNC in thyrocytes of young rats we observed the dystrophic changes of organelles similar to those in the group of animals with hypertension.

Nuclear membrane of most thyrocytes had distinct contours and deep invaginations (Fig. 4). Only a small amount of thyrocytes had nuclear membrane with sites of loosening. Periphery of nuclear matrix contained condensed chromatin, appeared as a dense ring around the nucleoplasm. Uniformly scattered granules of decondensed chromatin were observed in the center of matrix. The cytoplasm contained a small amount of

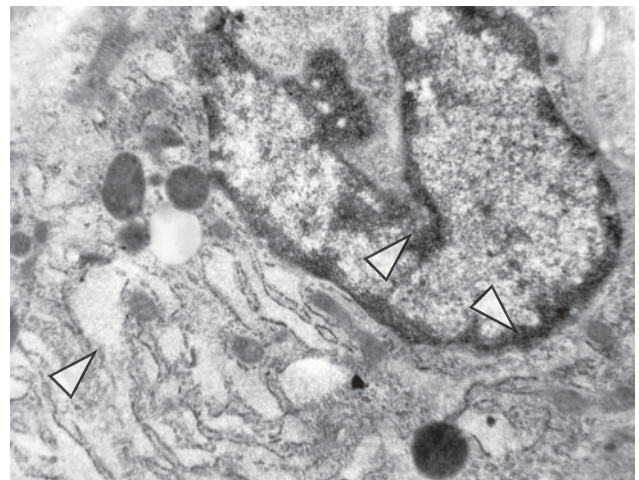


Рис. 4. Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс с АГ на 3-и сутки после введения ЯСК КК. Стрелками указаны инвагинации ядерной мембраны, конденсация хроматина, расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и разрыхление мембран. $\times 35\ 000$.

Fig. 4. Ultrastructure of thyrocytes of thyroid gland of young rats with hypertension to the day 3 after CBNC introduction. Invagination of nuclear membrane, chromatin condensation, extended cisterns of granular endoplasmic reticulum and membrane loosening. $\times 35,000$.



небольшое количество секреторных гранул. На цитоплазматической мембране, обращённой в просвет фолликула, были видны укороченные микроворсинки.

В препаратах, полученных на 7-е сутки после введения гипертензивным животным препарата ЯСК КК, ядра тиреоцитов имели неправильную форму, ядерная мембрана имела большое количество инвагинаций и не содержала очагов разрыхления, лизиса. Степень конденсации хроматина в ядре была ниже, чем в предыдущем сроке наблюдения. Перинуклеарные пространства были неодинаковыми на различных участках препарата. Мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума чётко контурированы и содержали большое количество рибосом, однако цистерны ретикулума были расширенными, как и в препаратах, полученных на предыдущем сроке наблюдения. В цитоплазме тиреоцитов располагались секреторные гранулы (рис. 5). Митохондрии имели электронно-прозрачный матрикс и небольшое количество крист. Отдельные тиреоциты содержали включения коллоида и вторичные лизосомы.

На 30-е сутки после введения экспериментальным животным с АГ препарата ЯСК КК ультраструктурная организация тиреоцитов приобретала нормальное строение. Ядра тиреоцитов содержали деконденсированный хроматин в виде мелких гранул по всей площади среза. Конденсированный хроматин локализован в виде глыбок на ядерной мембране. Перинуклеарные пространства имели постоянную ширину. Очагов разрыхления и лизиса ядерной мембраны не обнаружено. Гранулярный эндоплазматический ретикулум выглядел развитым, на его мембранах локализовались многочисленные рибосомы. Отдельные тиреоциты имели гиперплазированные мембраны гранулярной эндоплазматической сети. В цитоплазме отмечалось небольшое количество плотных гранул (рис. 6). Митохондрии тиреоцитов имели типичную нормальную форму и ультраструктуру. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи гипертрофирован, его гладкие мембраны на срезах имели подковообразную форму. В области его локализации располагалось большое число секреторных гранул округлой формы и различной электронной плотности.

Таким образом, проведенное электронно-микроскопическое исследование тиреоцитов молодых крыс с АГ показало наличие дистрофических и деструктивных ультраструктурных нарушений органов, степень выраженности которых зависела от сроков развития заболевания. На 30-е сутки после введения гипертензивным животным ЯСК КК тиреоциты приобретали нормальную организацию. Их ядра содержали деконденсированный хроматин, а митохондрии имели типичную форму и ультраструктуру.

dystrophically changed mitochondria, the matrix of those had medium electron density and homogeneous structure. Mitochondria cristae were loosened. Intracytoplasmic colloid granules were present. Lamellar cytoplasmic Golgi complex was reduced, around its membranes we observed lipid inclusions and secondary lysosomes. Cisterns of granular endoplasmic reticulum contained vacuoles. Only a small amount of ribosomes was present on its membranes. Cytoplasm of thyrocytes comprised a small number of secretory granules. Cytoplasmic membrane facing the lumen of the follicle had short microvilli.

In the sections procured to the 7th day after administration of CBNC to hypertensive animals we observed the thyrocyte with nuclei of irregular shape, nuclear membrane had a plenty of invaginations and did not contain the foci of loosening or lysis. Condensation degree of nuclear chromatin was lower than on previous observation term. Perinuclear spaces were irregular through the section. Granular endoplasmic reticulum membranes had distinct contours, numerous ribosomes were present on its membranes, however its cisterns were extended like sections of previous observation term. Cytoplasm of thyrocytes contained secretory granules (Fig. 5). Mitochondria had an electron transparent matrix and a small amount of cristae. Several thyrocytes contained the inclusion of a colloid and secondary lysosomes.

To the 30th day after CBNC treatment of the experimental animals with hypertension, the ultra-

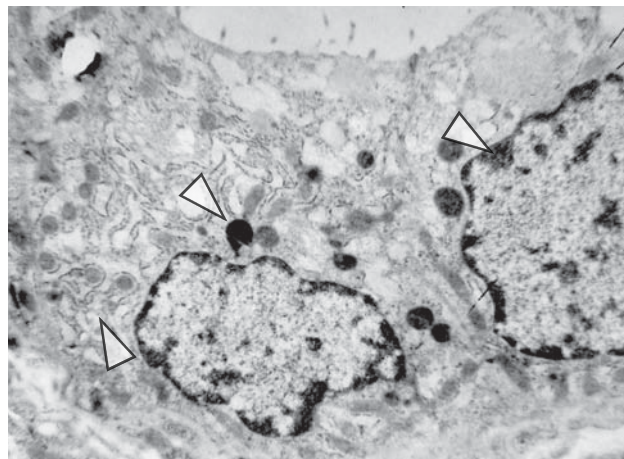


Рис. 5. Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс с АГ на 7-е сутки после введения ЯСК КК. Стрелками указаны деконденсированный хроматин в матриксе ядра, секреторные гранулы в цитоплазме, расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. $\times 32000$.

Fig. 5. Ultrastructure of thyrocytes of thyroid gland of young rats with hypertension to the 7th day after CBNC introduction. Arrows point to decondensed chromatin in the nucleus matrix, secretory granules in cytoplasm, extended cisterns of granular endoplasmic reticulum. $\times 32,000$.

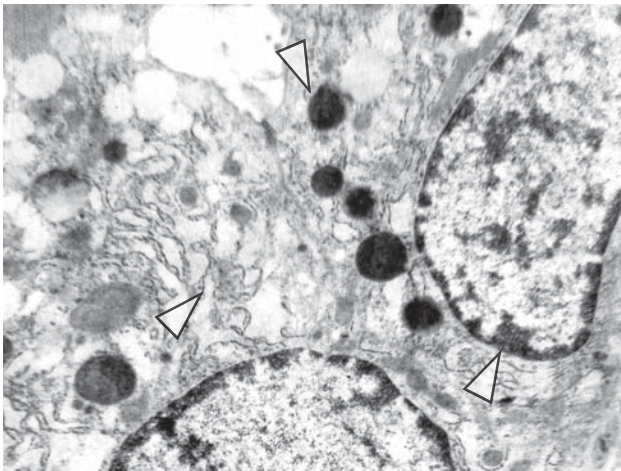


Рис. 6. Ультраструктура тиреоцитов молодых крыс с АГ на 30-е сутки после введения ЯСК КК. Стрелками указаны деконденсированный хроматин, многочисленные рибосомы на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума, плотные секреторные гранулы в цитоплазме. $\times 34\,000$.

Fig. 6. Ultrastructure of thyrocytes of young rats with AH to the 30th day after the introduction of CBNC. Arrows point to decondensed chromatin, numerous ribosomes on granular endoplasmic reticulum membranes, dense secretory granules in cytoplasm. $\times 34,000$.

При этом в группе животных с АГ после введения ЯСК КК показатели артериального давления возвращались к нормальным ($(115,5 \pm 3,2)/(72,5 \pm 2,4)$ мм рт. ст.).

Данные проведенных нами экспериментальных исследований подтверждаются результатами работ А.Б. Смолянинова [6], К.Г. Суркова и соавт. [7], которые свидетельствуют об эффективности препарата пуповинной крови человека, которая выражалась в снижении выраженности поражения сердечно-сосудистой системы, мозга, восстановления функций нервной системы.

Выводы

Проведенные исследования позволили установить, что стресс-индуцированная неврогенная артериальная гипертензия сопровождается изменением ультраструктуры тиреоцитов животных. После развития стойкой АГ эти изменения затрагивают все клеточные структуры, в частности ядерную мембрану (разрыхления, инвагинации), хроматин (конденсация), рибосомы и полисомы (снижение количества); митохондрии (снижение количества, дезорганизация крист); гранулярную эндоплазматическую сеть (разрыхление мембран, расширение цистерн); комплекс Гольджи (редукция). Введение препарата криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови приводит к нормализации субмикроскопической архитектоники тиреоцитов. На 30-е сутки после введения препарата в клетках

structure of thyrocytes gained a normal pattern, characteristic for intact rats. Nuclei of thyrocytes contained a decondensed chromatin, scattered as fine granules throughout the section area. Condensed chromatin appeared as clumps and was localized on nuclear membrane. Perinuclear spaces were of a constant width. No loosening foci and lysis of nuclear membrane were found. Granular endoplasmic reticulum was well developed, numerous ribosomes were localized on its membranes. Several thyrocytes contained granular endoplasmic reticulum membranes with signs of hyperplasia. The cytoplasm comprised a few dense granules (Fig. 6). Mitochondria of thyrocytes had a typical normal shape and ultrastructure. Lamellar cytoplasmic Golgi complex was hypertrophied, its smooth membranes appeared on the sections as horseshoes. Around its location we observed numerous secretory granules with a round shape and different electron density.

Thus performed by us electron microscopic examination of the thyroid gland of thyrocytes of young rats with hypertension showed the presence of dystrophic and destructive ultrastructural disorders of organelles, the severity of those varied depending on the development of the disease. To the 30th day after the administration to hypertensive animals of CBNC ultrastructure of thyrocytes gained normal structure. Nuclei of thyrocytes contained decondensed chromatin, and mitochondria had a typical shape and ultrastructure.

The indices of blood pressure in animals with AH treated with CBNCs turned to the norm ($(115,5 \pm 3,2)/(72,5 \pm 2,4)$ mm Hg)

The data obtained in our study are confirmed by reported by Smolyaninov [6], and Surkov et al. [7] efficiency exhibited by human cord blood preparations, in terms of decreasing of cardiovascular system and brain injury, as well as restoration of neural functions.

Conclusions

Conducted investigations allowed to reveal the changes in thyrocyte ultrastructure of animals suffered from stress-induced neurogenic arterial hypertension. To the 30th day after development of stable hypertension these changes were found in all the cell structures, in particular: nuclear membrane (loosening, invaginations); chromatin (condensation); ribosomes and polysomes (decreased number); mitochondria (decreased number; disorganisation of cristae); granular endoplasmic reticulum (loosening of membranes; expansion of cisterns); Golgi complex (reduction). Administration of cryopreserved nucleated cells of cord blood resulted in normalization of thyrocytes ultrastructure. To the 30th day after cell introduction we observed among other things the hyperplasia of granular endoplasmic reticulum and increased number of cristae in mitochondria, hypertrophia of cytoplasmic Golgi apparatus, absence of nuclear membrane loosening and lysis.



отмечены гиперплазия гранулярного эндоплазматического ретикулаума и увеличение количества крист в митохондриях, гипертрофия цитоплазматического комплекса Гольджи, отсутствие очагов разрыхления и лизиса ядерной мембраны.

Анализ изменений субмикроскопической организации органелл тиреоцитов молодых крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией на фоне введения криоконсервированного препарата ядросодержащих клеток кордовой крови дает основание для проведения дальнейших исследований механизмов действия препаратов, полученных из кордовой крови, в терапии артериальной гипертензии.

Литература

1. Глюкман Э.Д. Пуповинная кровь как источник гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, №1. – С. 12–14.
2. Емельянов Д.Н., Шараевская М.В., Смирнова Т.С., Дегтярь Ю.В. Морфо-функциональные особенности щитовидной железы при хроническом стрессе // Успехи современного естествознания. – 2008. – №12. – С. 44–45.
3. Ланг Г.Ф. Гипертоническая болезнь. – Медгиз, 1950. – 459 с.
4. Насадюк К.М. Состояние и перспективы криохранения и клинического применения пуповинной крови в Украине // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, №1. – С. 98–104.
5. Петунина Н.А. К вопросу о состоянии сердечно-сосудистой системы при нарушении функции щитовидной железы // Международный эндокринологический журнал. – 2007. – №4(10). – С. 97–102.
6. Смолянинов А.Б. Клеточные и генные технологии в кардиологии. – СПб, 2009. – 175 с.
7. Сурков К.Г., Белова Л.А., Красняков В.К. Доклиническое исследование отечественного препарата стволовых клеток пуповинной крови «Криоцелл» // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – №1(3). – С. 74–77.
8. Шош Й. Неврогенная гипертония // Моделирование заболеваний / Под ред. С.В. Андреева. – М: Медицина, 1981. – С. 246–247.
9. Патент № 92227 Україна МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна Т.М. та інші.; №200814009; заявлено 05.12.2008; опубл. 11.10.2010; Бюл. №19.
10. Патент №67199 Україна МПК G09B23/28. Спосіб моделювання стрес-індукованої артеріальної гіпертензії / Л.В. Бабійчук, В.Г. Бабійчук, О.В. Козлов, В.В. Мамонтов; заявник: ІПКіК НАН України. – №201108117; заявлено 29.06.2011; опубл. 10.02.2012; Бюл. №3.
11. Harris D.T. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications // Stem Cell Rev. – 2008. – Vol. 4, №4. – P. 269–274.
12. Moise K.J. Jr. Umbilical cord stem cells // Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 106, №6. – P. 1393–1407.
13. Newcomb J.D., Willing A.E., Sanberg P.R. Umbilical cord blood cells // Methods Mol. Biol. – 2009. – Vol. 54, №9. – P. 119–136.
14. Vanichsetakul P. Clinical use of cord blood for stem cell transplantation // J. Med. Assoc. Thai. – 2005. – Vol. 88, №2. – P. 93–100.

Analysis of changes in submicroscopic organization of thyrocyte organelles of young rats with neurogenic stress-induced hypertension on the background of administering the cryopreserved cord blood nucleated cell preparation allow to plan further investigations in terms of revealing the mechanisms of the effect exhibited by preparations derived from cord blood during treatment of hypertension.

References

1. Gluckman E.D. Cord blood as the source of hemopoietic stem cells for transplantation // Cell Transplantation and Tissue Engineering – 2011. – Vol. 6, N1. – P.12–14.
2. Yemelyanov D.N., Sharaevskaya M.V., Smirnova T.S., Degtyar Yu.V. Morphofunctional peculiarities of thyroid gland at chronic stress // Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya – 2008. – №12. – P. 44–45.
3. Lang G.F. Hypertonic disease. – Leningrad: Medgiz, 1950. – 459 p.
4. Nasadyuk K.M. State and perspective of cryostorage and clinical application of umbilical blood in Ukraine // Cell Transplantation and Tissue Engineering – 2011.– Vol. 6, N1. – P. 98–104.
5. Petunina N.A. To the question on the state of cardiovascular system at disorder of thyroid gland // Mezhdunarodnyy Endokrinologicheskyy Zhurnal. – 2007. – №4(10). – P. 97–102.
6. Smolyaninov A.B. Cell and gene technologies in cardiology. – St.-Peterburg, 2009. – 175 p.
7. Surkov K.G., Belova L.A., Krasnyakov V.K. Preclinical investigation of stem cell preparation 'Cryocell' // Cell Transplantation and Tissue Engineering. – 2006. – N1(3). – P. 74–77.
8. Shosh I. Neurogenic hypertension // Disease Modeling / Ed. by S.V. Andreyev. – Moscow: Meditsina. – 1981. – P. 246–247.
9. Patent N92227 Ukraine IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of nucleated cells of cord blood including hemopoietic stem cells / L.O. Babiychuk, V.I. Grischenko, T.M. Gurina et al.; №200814009; Filed 05.12.2008; Publ.11.10.2010. – Bul. Nr. 19.
10. Patent № 67199 Ukraine, IPC G09B 23/28. Method of modeling stress-induced arterial hypertension / L.V. Babiychuk, V.G. Babiychuk, O.V. Kozlov, V.V. Mamontov; Filed 29.06.2011, Publ. 10.02.2012. – Bul. Nr. 3.
11. Harris D.T. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications // Stem Cell Rev. – 2008. – Vol. 4, N4. – P. 269–274.
12. Moise K.J. Jr. Umbilical cord stem cells // Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 106, №6. – P. 1393–1407.
13. Newcomb J.D., Willing A.E., Sanberg P.R. Umbilical cord blood cells // Methods Mol. Biol. – 2009. – Vol. 54, N9. – P. 119–136.
14. Vanichsetakul P. Clinical use of cord blood for stem cell transplantation // J. Med. Assoc. Thai. – 2005. – Vol. 88, N2. – P. 93–100.

