

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА»

На правах рукописи

Цомартова Дибакан Асланбековна

**ПОСТНАТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ И СЕКРЕТОРНАЯ
ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ НАДПОЧЕЧНИКОВ
В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
д. м. н. Н.В. Яглова

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Развитие надпочечников	
1.2. Становление секреторной деятельности надпочечников в онтогенезе	17
1.3. Транскрипционная регуляция морфогенетических процессов в надпочечниках	26
1.4. Современное состояние проблемы эндокринных дисрапторов	33
1.5. Влияние ДДТ на гистофизиологию надпочечных желез	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
3.1. Морфологические изменения надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	52
3.1.1. Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы пубертатного возраста	52
3.1.2. Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы после наступления половой зрелости	68
3.2. Изменения транскрипционной регуляции морфогенетических процессов в надпочечниках крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	93

3.2.1. Изменения канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в надпочечниках крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	93
3.2.2. Изменения канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в надпочечнике крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	103
3.2.3. Изменения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Hhex эндокриноцитами надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	110
3.2.4. Изменения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Hhex эндокриноцитами надпочечников крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	113
3.2.5. Исследование пролиферативной активности эндокриноцитов коркового и мозгового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	116
3.2.6. Исследование пролиферативной активности эндокриноцитов коркового и мозгового вещества надпочечников крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	121

3.2.7. Роль транскрипционного фактора PRH/Hhex и канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в регуляции процессов пролиферации эндокриноцитов надпочечника	124
3.3. Изменения секреторной деятельности кортикостероцитов надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	130
3.3.1. Изменения продукции гормонов коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	130
3.3.2. Изменения ультраструктуры кортикостероцитов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы пубертатного возраста	132
3.3.3. Изменения продукции гормонов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста	162
3.3.4. Изменения ультраструктуры кортикостероцитов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста	164
3.4. Изменения секреторной деятельности хромоаффинных клеток надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только	187

в постнатальном периодах онтогенеза	
3.4.1. Изменения продукции катехоламинов у крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза	187
3.4.2. Ультраструктура хромаффинных клеток у крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы	188
3.4.3. Изменения продукции катехоламинов у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста	201
3.4.4. Ультраструктура хромаффинных клеток у крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы	202
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	216
Заключение	245
Выводы	251
Список литературы	255

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АКТГ – адренотропный гормон

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть

ДДД – дихлордифенилдихлорэтан

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ДДЭ – дихлордифенилдихлорэтилен

КГ – комплекс Гольджи

Кп – капилляр

Л – лизосома

ЛК – липидная капля

М – митохондрия

ПК – просвет капилляра

ПКП – перикапиллярное пространство

Р – рибосома

СГ – секреторная гранула

СОЗ – стойкий органический загрязнитель

ТДЭ – 1,1'-(2,2-дихлорэтилен)-бис [4-хлорбензол]

Э, ЭР – эритроцит

ЭДТА – этилен

Эн – эндотелиоцит

ЭПС – эндоплазматическая сеть

Я – ядро

Яд – ядрышко

AP-2 β – activating protein 2 β

APC – adenomatous polyposis coli комплекс

Ascl1 – achaete-scute homolog 1

BMP – bone morphogenetic protein, костные морфогенетические белки

СК1 α – казеинкиназа 1 α

CYP11a1 – 20,22-десмолаза

CYP11b1 – 11 β -гидроксилаза

CYP11b2 – альдостеронсинтаза

CYP17 – 17 α -гидроксилаза

CYP21 – 21-гидроксилаза

Dlk1 – protein delta homolog 1

E – сутки пренатального развития

GSK3 β – киназа 3 β гликогенсинтазы

Hand2 – heart and neural crest derivatives-expressed protein

LEF/TCF – lymphoid enhancer factor/T-cell factor

P – сутки постнатального развития

PNMT – фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза

PRH/Hhex- prolin-rich homeodomen/haematopoietically expressed homeodomen

Phox2b – paired-like homeobox 2b

SF-1 – steroidigenic factor 1

Wnt – wingless-like MMTV integration site

WTX – Wilms Tumor gene on the X-chromosome

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования: Воздействие эндокринных дисрапторов – веществ антропогенного происхождения, нарушающих любые аспекты секреции и действия гормонов, является глобальной проблемой [98]. Увеличение числа заболеваний эндокринной и иммунной систем, особенно в детском возрасте, уменьшение возраста полового созревания, нарушения репродуктивной функции и увеличение частоты онкологических заболеваний указывают на роль не только генетических, но и эндокринных и антропогенных факторов [74, 90, 175].

Влияние эндокринных дисрапторов на организм имеет широкие масштабы, так как происходит не только и не столько в производственной сфере, сколько в быту, что обуславливает не только научную, но и высокую медико-социальную значимость проблемы. На сегодняшний день известно более тысячи веществ, обладающих свойствами эндокринных дисрапторов [89, 91]. По данным мониторинга они выявляются в крови, моче, жировой ткани, а также в плаценте и пуповинной крови [132]. Наиболее распространенным на планете эндокринным дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), а самым частым источником его низкодозового воздействия – продукты питания [134, 198]. Это обусловлено как широким использованием ДДТ в 20-м, так и возобновившимся применением в 21-м веке [216].

Проблема воздействия гормоноподобных соединений была озвучена еще в 90-ые годы прошлого века. Научный доклад Американского общества эндокринологов, сделанный в 2009 г., стал первым общественным заявлением по этой проблеме со стороны одного из ведущих международных медицинских обществ, поставив перед исследователями ряд масштабных задач [99]. В первую очередь это фундаментальные исследования в области клеточной биологии, гистологии, эмбриологии и биохимии, направленные на изучение проявлений и механизмов действия дисрапторов, а также их влияния на развитие органов и систем. Решение этих проблем позволило бы не только снизить заболеваемость по ряду наиболее распространенных патологий, включая онколо-

гические заболевания, но и способствовать увеличению продолжительности жизни. Одним из важных разделов исследований является влияние эндокринных дисрапторов на развитие и функционирование надпочечников – желез, регулирующих все виды обмена веществ, а также работу сердечно-сосудистой, иммунной и репродуктивной системы.

Степень разработанности проблемы. В научной литературе представлены результаты серии исследований по влиянию различных доз ДДТ в пренатальном периоде на развитие и функционирование женской и мужской половой систем [194], а также дисрапторному действию ДДТ на функционирование щитовидной железы [13, 14]. Имеются данные о влиянии ДДТ на развитие нервной системы потомства. Исследования по выявлению особенностей пренатального и постнатального морфогенеза эндокринных желез и механизмов дисрапторного действия на сегодняшний день немногочисленны [8, 15], что обусловлено значительными методологическими трудностями, связанными с необходимостью отказа от стандартных токсикологических подходов и проведению экспериментов с крайне низкими дозами дисрапторов. В 70-90-е годы прошлого века метаболиты ДДТ изучались как потенциальные противоопухолевые средства для лечения аденокарциномы надпочечников, что было связано с их способностью вызывать селективный некроз клеток пучковой зоны [238]. Однако в этих исследованиях была выявлена различная видовая чувствительность животных к действию больших доз метаболитов ДДТ и относительно низкая эффективность при воздействии на человека, вследствие чего эти исследования утратили актуальность. Воздействие низких доз, имеющих дисрапторное, а не токсичное действие на надпочечники, изучено крайне мало [158], а работы, посвященные постнатальному морфогенезу коркового и мозгового вещества и секреторной деятельности кортикостероцитов и хромаффинных клеток при воздействии на организм в пренатальном и постнатальном периодах развития организма, практически отсутствуют.

Цель работы: исследовать постнатальный морфогенез и секреторную деятельность надпочечников крыс при развитии организма в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Задачи исследования:

1. Определить основные закономерности морфогенеза клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в пубертатном и постпубертатном периодах постнатального этапа онтогенеза при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
2. Определить основные закономерности морфогенеза мозгового вещества надпочечников крыс в пубертатном и постпубертатном периодах постнатального этапа онтогенеза при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
3. Установить роль канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга в постнатальном морфогенезе клубочковой, пучковой и сетчатой зон у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
4. Установить роль канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга в постнатальном морфогенезе мозгового вещества у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
5. Исследовать экспрессию транскрипционного фактора PRH/Nhex и его связь с активацией канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга и пролиферацией кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
6. Исследовать экспрессию транскрипционного фактора PRH/Nhex и его связь с активацией канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга и пролиферацией хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечников у крыс

контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.

7. Оценить влияние пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ на синтез стероидных гормонов и катехоламинов в пубертатном и постпубертатном периодах постнатального этапа онтогенеза.
8. Выявить изменения ультраструктурных и биохимических показателей секреторной деятельности кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в пубертатном и постпубертатном периодах постнатального этапа онтогенеза при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.
9. Выявить изменения ультраструктурных и биохимических показателей секреторной деятельности хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс в пубертатном и постпубертатном периодах постнатального этапа онтогенеза при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.

Научная новизна

Впервые установлены основные закономерности постнатального морфогенеза надпочечников и особенности развития и функционирования клубочковой, пучковой, сетчатой зон коркового и хромаффинных клеток мозгового вещества при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.

Установлена роль канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга в развитии пучковой и сетчатой зон коркового вещества и хромаффинных клеток мозгового при переходе от пубертатного периода к половой зрелости.

Выявлено, что одним из механизмов дисрапторного действия ДДТ на постнатальный морфогенез надпочечников является нарушение активации канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга в кортикостероцитах и хромаффинных клетках.

Впервые установлена ранее неизвестная закономерность, заключающаяся в способности хромаффинных клеток надпочечников крыс экспрессировать транскрипционный фактор PRH/Nhex в различные периоды постнатального развития, и показана связь между снижением пролиферативной активности хромаффинных клеток и активацией экспрессии в них PRH/Nhex в постнатальном периоде онтогенеза.

Показано дисрегуляторное действие ДДТ на контроль транскрипционным фактором PRH/Nhex пролиферативных процессов во всех зонах коркового вещества надпочечников и разобщающее действие ДДТ на кооперацию в экспрессии PRH/Nhex и активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках, являющееся одной из причин нарушения развития мозгового вещества надпочечников.

Показана способность низких доз ДДТ одновременно нарушать секрецию минералокортикоидов, глюкокортикоидов и половых стероидов в периоде полового созревания при пренатальном и постнатальном воздействии дисраптора.

Впервые установлено, что низкие дозы ДДТ способны оказывать дисрапторное действие на продукцию катехоламинов.

Установлено, что независимо от типа секреции эндокриноцитов надпочечников и вида продуцируемых ими гормонов наиболее чувствительными к дисрапторному действию ДДТ органеллами являются митохондрии, гибель которых и нарушение возрастной реорганизации, являются одной из основных причин нарушения секреторных процессов как в кортикостероцитах, так и в хромаффинных клетках.

Научно-практическая значимость

Полученные в настоящем исследовании данные являются основой, формирующей концепцию о дисрапторном действии низких доз ДДТ на развитие и функционирование надпочечников.

Установлено дисморфогенетическое действие низких доз ДДТ в пределах их максимально допустимых уровней потребления человеком как на корковое, так и мозговое вещество надпочечных желез.

Выявленные нарушения темпов развития различных структурно-функциональных зон и сопутствующие им нарушения гормонального статуса являются основой для изучения вклада этих изменений в различные соматические заболевания детского возраста и взрослых. Полученные данные о последствиях пренатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ позволяют определять группы риска по нарушениям развития надпочечников и сопутствующих им заболеваниям у новорожденных.

Установленная способность эндокринного дисраптора ДДТ нарушать транскрипционную регуляцию морфогенетических процессов имеет большое значение для изучения дисморфогенетических эффектов эндокринных дисрапторов и их механизмов.

Выявленная способность хромаффинных клеток экспрессировать транскрипционный фактор PRH/Nhex в постнатальном развитии и его влияние на пролиферативные процессы в мозговом веществе являются основой для изучения новых цитогенетических механизмов развития хромаффинных клеток надпочечников.

Полученные данные свидетельствуют о небезопасности низких доз ДДТ в пределах их максимально допустимых уровней в пищевых продуктах и питьевой воде согласно нормативным документам.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности:

Диссертационное исследование соответствует п. 5, 6 области исследования паспорта специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Методология и методы исследования:

Методология исследования основана на динамической комплексной оценке морфогенетических и секреторных процессов в корковом и мозговом веществе надпочечников крыс при непрерывном воздействии эндокринного

дисраптора в пренатальном и постнатальном периодах. Сроки исследования определены на основе анализа данных научной литературы о наиболее важных этапах в постнатальном развитии надпочечников крыс. Подбор доз и способ их введения основан на нормативных документах, регламентирующих содержание ДДТ в пищевых продуктах, питьевой воде, с учетом особенностей метаболизма ДДТ в организме крысы. В экспериментальном исследовании использован комплекс морфологических (световая микроскопия и компьютерная морфометрия гистологических препаратов, иммуногистохимия с количественной оценкой результатов, трансмиссионная электронная микроскопия с компьютерной ультраморфометрией), биохимических (иммуноферментный анализ) и статистических методов.

Степень достоверности и апробация результатов:

Достоверность результатов обеспечивается последовательным определением задач и подбором комплекса адекватных им современных методов исследования, позволяющих достичь цели исследования, формированием репрезентативных контрольных и экспериментальных групп, использованием комплекса статистических методов для оценки статистической значимости выявленных изменений и сравнительным анализом собственных данных с данными других исследователей.

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом» (Новосибирск, 2017), V Съезде Российского общества патологоанатомов с международным участием (Челябинск, 2017), XXV Международной конференции «Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта, 2017), XXIII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), XIV Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018), XXVI Международной конференции «Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта, 2018), XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018), Всерос-

сийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных» (Витебск, респ. Беларусь, 2019).

Личное участие автора заключалось в определении задач исследования, планировании и проведении экспериментов, получении научных данных, их статистической обработке, анализе, написании публикаций.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университета им. И.М. Сеченова и ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов.

Положения, выносимые на защиту

1. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах изменяет постнатальный морфогенез надпочечников, снижая темпы развития мозгового вещества, клубочковой и сетчатой зон коркового вещества, и не оказывает влияния на темпы развития пучковой зоны. Деструктивные изменения в наружной части пучковой зоны в пубертатном периоде возникают вследствие нарушений гемодинамики на границе клубочковой и пучковой зон, связанных с недостаточной продукцией катехоламинов, а после достижения половой зрелости – также и с иммунноопосредованной фокальной гибелью клеток.
2. Одним из механизмов дисрапторного действия ДДТ на постнатальный морфогенез надпочечников является изменение активации канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга, а также нарушение регуляции транскрипционным фактором PRH/Nhex пролиферативных процессов в кортикостероцитах и хромаффинных клетках.
3. Воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии вызывает нарушение секреции всех видов стероидных гормонов надпочечни-

ков к пубертатному периоду и более выраженное и длительно протекающее снижение продукции катехоламинов. Нарушения секреторной деятельности надпочечников обусловлены как дисморфогенетическими причинами, так и нарушением функционирования митохондрий клеток.

Публикации:

По теме диссертационного исследования опубликовано 27 печатных работ, включая 15 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций.

Объем и структура диссертации:

Материалы диссертации изложены на 278 страницах текста и состоят из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 108 рисунками и 15 таблицами. Список литературы включает 243 источника, из них 16 отечественных и 227 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.6. Развитие надпочечников

Корковое и мозговое вещество надпочечников развиваются из разных эмбриональных зачатков. Корковое вещество является производным висцерального листка спланхнотома мезодермы, а мозговое развивается из клеток нервного гребня [114].

Первой стадией развития надпочечников является разрастание развивающегося из мезодермы, экспрессирующего Nr5a1 (Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1: Sf1 или Ad4BP), целомического эпителия и подлежащих мезонефральных клеток мезенхимы, образующих адрено-гонадный зачаток, располагающийся между урогенитальной складкой и дорсальной брыжейкой [96, 97, 141]. Ведущим фактором в развитии адреногенитального зачатка является стероидогенный фактор Sf1 [200, 225]. У крыс на 11,5 сутки внутриутробного развития появляются симметричные тяжи Sf1-позитивных клеток, идущие от дорсальной аорты до целомического эпителия урогенитальной складки. На 12,5 сутки происходит разделение адреногенитального зачатка на зачатки надпочечника и гонад [126]. На 15-ые сутки начинается миграция клеток нервного гребня в развивающийся надпочечник, которая продолжается вплоть до рождения особи [77, 164]. Дальнейшая дифференцировка этих клеток в хромаффинные клетки обеспечивает формирование дефинитивного мозгового вещества надпочечника.

Развитие коркового вещества

Корковое вещество надпочечника формирует три функциональные зоны: клубочковую, продуцирующую минералокортикоиды (преимущественно альдостерон), пучковую, синтезирующую глюкокортикоиды (преимущественно кортизол у приматов и кортикостерон у грызунов), а также сетчатую зону, продуцирующую половые гормоны. По данным Т. Roos, проводившего гистологические и биохимические исследования надпочечника крысы, к 18-м суткам внутриутробного развития железа гистологически полностью сформирована.

Она покрыта капсулой, под которой находится корковое вещество с различной базофильной клубочковой зоной, пучковой и сетчатой зонами [192].

Пролиферативная активность клеток надпочечников крыс изменяется во внутриутробном периоде не только количественно, но и качественно. На 16-18-ые сутки внутриутробного развития они составляют около 20%, а с 19-ых суток и до рождения особи их численность уменьшается в три раза. Изначально они не имеют специфической локализации. У новорожденных они выявляются в наружной части органа и в центре. У 7-дневных крыс их количество составляет 3-5% от общего количества клеток, и располагаются они субкапсулярно и в недифференцированной зоне. В возрасте 1 месяца пролиферирующие клетки составляют менее 1% и локализуются в недифференцированной зоне, в верхней части пучковой зоны и на границе коркового и мозгового вещества [164]. Сопоставление функционального становления коркового вещества и локализации пролиферирующих клеток показывает, что формирование зональности в корковом веществе происходит с одновременной концентрацией делящихся клеток в промежуточной зоне, находящейся между клубочковой и пучковой зонами, и центростремительной миграцией их к границе коркового и мозгового вещества. Эти данные показывают, что промежуточная зона является своего рода зоной недифференцированных клеток, поддерживающих зональность коры надпочечников. Трудностью в определении функции этих клеток является отсутствие у них специфических маркеров, в том числе и стероидогенных.

После рождения масса надпочечников увеличивается линейно до 70-го дня [22]. Темпы постнатального развития коркового вещества более высокие, чем мозгового [135]. В корковом веществе тоже отмечаются разные темпы развития и формирования структурно- функциональных зон. Клубочковая зона формируется быстрее [169]. Пучковая зона приобретает свою типичную структуру на 13-ые и достигает максимума развития на 70-ые сутки [22, 169]. Сетчатая зона отчетливо выделяется на 10-ые сутки, ее площадь и доля в площади коры увеличивается также до 70-х суток [22].

Репаративные процессы и ремоделирование коркового вещества в постнатальном развитии согласно наиболее распространенной точке зрения осуществляется за счет миграции и дифференцировки плюрипотентных клеток, источником которых является субкапсулярная зона [57, 197, 227, 234, 236]. Однако в научной литературе имеются данные, указывающие на другие способы восстановления клеточной популяции кортикостероцитов. Показано, что дифференцированные клетки клубочковой зоны способны переходить в пучковую зону и приобретать способность синтезировать глюкокортикоиды [24, 25].

С возрастом в надпочечниках наблюдается уменьшение доли коркового вещества, расширение гистогематического барьера, увеличение толщины базальной мембраны капилляров, увеличение числа фенестр в стенке капилляров [6]. Рядом авторов было описано появление лимфоцитарной инфильтрации в корковом веществе у стареющих крыс, а также собак, что рассматривалось ими как проявление латентного адреналита или иммуноопосредованной атрофии надпочечников [37, 63]. Молекулярные и клеточные механизмы этого явления мало изучены. Аутопсийные исследования показали, что у людей старческого и пожилого возраста, не имеющих эндокринных и аутоиммунных расстройств, аналогично выявляется лимфоцитарная инфильтрация коркового вещества с превалированием Т-хелперов в составе инфильтрата, что также рассматривалось авторами как развитие адреналита с аутоиммунным компонентом [107].

Развитие мозгового вещества

Происхождение хромаффинных клеток и по настоящее время является спорным вопросом. Ранее считалось, что хромаффинные клетки и симпатические нейробласты происходят от общей предшественницы – симпатoadреналовой клетки [144]. Эта точка зрения была основана на способности хромаффинных клеток приобретать нейроподобный фенотип при стимуляции фактором роста нервов (nerve growth factor, NGF) [32, 86]. Также было показано, что хромаффинные клетки и симпатические нейробласты на 11,5 день эмбрионального развития у мышей экспрессируют одинаковый набор поверхностных антигенов, вследствие чего их было невозможно различить [33]. Помимо этого,

существовала точка зрения об их происхождении из проспонгиобластов [9]. Недавние исследования показывают, что большинство хромаффинных клеток возникают из предшественников шванновских клеток [170].

Хромаффинные клетки надпочечников вначале появляются среди клеток, экспрессирующих тирозингидроксилазу, у которых в дальнейшем подавляется экспрессия нейронных и сохраняется экспрессия катехоламинергических маркеров [202].

У грызунов анатомическая сегрегация развивающихся хромаффинных клеток происходит путём дифференцировки превертебральных симпатических нейробластов, когда хромаффинные клетки мигрируют в поперечном направлении, сливаясь в центре с клетками коркового вещества надпочечников [124, 139]. Клеточные массы, попавшие внутрь коркового вещества, группируются в скопления, которые располагаются среди клеток коры в виде шаров. Образование хромаффинобластов в надпочечниках крыс начинается на 18–19-ые сутки пренатального развития и заканчивается к 10-му дню после рождения [9].

Пролиферативная активность хромаффинных клеток невысока. У мышей на 12,5 сутки пренатального развития только 20% клеток входят в митотический цикл. Такой уровень пролиферации сохраняется до 16,5 суток [58]. Затем митотическая активность клеток снижается до 30-х суток, после чего стабилизируется. Постнатальное развитие мозгового вещества связано с увеличением числа хромаффинных клеток и только после 7-го месяца – кровеносных сосудов [5]. Несмотря на достаточный пролиферативный потенциал регенераторная способность мозгового вещества меньше, чем коркового [1].

1.7. Становление секреторной деятельности надпочечников в онтогенезе

Формирование и развитие секреторных процессов в кортикостероцитах

Зональная экспрессия стероидогенных ферментов в корковом веществе начинается в пренатальном периоде. CYP11b1 появляется в коре на 13,5 сутки, CYP11b2 и рецептор ангиотензина At1b – перед рождением особи [78, 80, 105]. На этом этапе экспрессия в клетках CYP11b1 и CYP11b2 является взаимоис-

ключающей, что создает основы для формирования функциональных зон в корковом веществе [164].

Ультраструктурные и биохимические основы секреторной деятельности кортикостероцитов активно изучались во второй половине двадцатого века. Благодаря этим исследованиям были установлены последовательность реакций стероидогенеза, ферменты, катализирующие эти реакции, и их внутриклеточная локализация, особенности поступления исходных веществ и выделения гормонов из клеток.

На сегодняшний день общепринятым является существование двух источников исходного для стероидогенеза вещества – холестерина. 60-70% холестерина, который используется для синтеза стероидов, поступает в клетки из плазмы крови. Оставшиеся 30-40% – это эндогенный холестерин, который синтезируется в кортикостероцитах и депонируется в цитоплазме в виде липидных капель. Он находится в этерифицированной форме. Расщепление эфиров холестерина и жирных кислот происходит в цитоплазме. Свободный холестерин поступает в митохондрии, где превращается в прегненолон [121]. Поступление холестерина в митохондрии контролируется белком StAR (steroidogenic acute regulatory protein), локализованным в мембране митохондрий [199]. Затем прегненолон транспортируется из митохондрий в гладкую ЭПС. Дальнейшие реакции превращения прегненолона происходят в ЭПС и цитоплазме. Завершающие реакции синтеза альдостерона и кортикостерона из дезоксикортикостерона также происходят в митохондриях. Кортикостероциты секретируют гормоны агранулярным способом, то есть не депонируют синтезированный гормон в цитоплазме, в связи с чем уровень выделения гормона в кровеносное русло отражает уровень его синтеза в клетках [121]. Таким образом, митохондрии и гладкая ЭПС являются основными органеллами, обеспечивающими стероидогенез.

Исследования ультраструктурных изменений кортикостероцитов при различных видах стимуляции показало, что усиление синтеза стероидов проявляется увеличением размеров клеток и ядер, размеров митохондрий, просветлением их матрикса, расширением крист и просветлением их содержимого.

Ультраструктура митохондрий кортикостероцитов различных зон коркового вещества отличается [138]. В клубочковой зоне митохондрии имеют пластинчатые кристы, а в пучковой и сетчатой - везикулярные. Усиление синтеза стероидов приводит к трансформации пластинчатых крист в везикулярные. Важным признаком активации фазы синтеза стероидов является слияние липидных капель с мембранами митохондрий, образование выростов наружной мембраны митохондрий, их контакт с липидными каплями. Также отмечается увеличение везикул ЭПС, уменьшение числа и размеров липидных капель и увеличение гЭПС и комплекса Гольджи, что связано с активацией синтеза ферментов [39, 85, 106, 162, 172, 173].

Снижение функциональной активности кортикостероцитов проявляется уменьшением размеров клеток, уменьшением гладкой ЭПС, накоплением липидных включений и гликогена, уменьшением размеров митохондрий и трансформацией везикулярных крист в тубулярные, увеличением числа лизосом [157].

Особенности стероидогенеза в корковом веществе надпочечников у крыс

У крыс стероидогенез в корковом веществе надпочечников имеет свои видовые особенности, отличающие его от синтеза минералокортикоидов, глюкокортикоидов и половых стероидов у человека. Причиной является низкая активность CYP17, катализирующей реакцию гидроксилирования прегненолона и прогестерона с образованием 17-оксипрогестерона (рис. 1), конечным продуктом превращения которого в кортикостероцитах пучковой зоны является кортизол, а в сетчатой зоне – дигидроэпиандростерон [22]. Ранее считалось, что у крыс активность этого фермента в корковом веществе надпочечников отсутствует [21, 129], что объясняет, почему у крыс основным глюкокортикоидом является кортикостерон, а не кортизол. Другими авторами было показано, что в корковом веществе обнаруживаются продукты 17 α -гидроксилирования [22]. В кортикостероцитах клубочковой и пучковой зон крыс синтез стероидных гормонов происходит одинаково путем превращения прогестерона в 11-дезоксикортикостерон и отличается только последней реакцией, в которой в

пучковой зоне 11-дезоксикортикостерон превращается в кортикостерон, а в клубочковой – в альдостерон [51]. Соответственно, клетки клубочковой и пучковой зон имеют практически одинаковый набор ферментов, катализирующих данные реакции. Поскольку синтез ферментов стимулируется аденокортикотропным гормоном (АКТГ), то у крыс чувствительность клеток клубочковой зоны в АКТГ более высокая, чем у человека [52]. Особенностью стероидогенеза в сетчатой зоне крыс является крайне низкая продукция дегидроэпиандростерона.

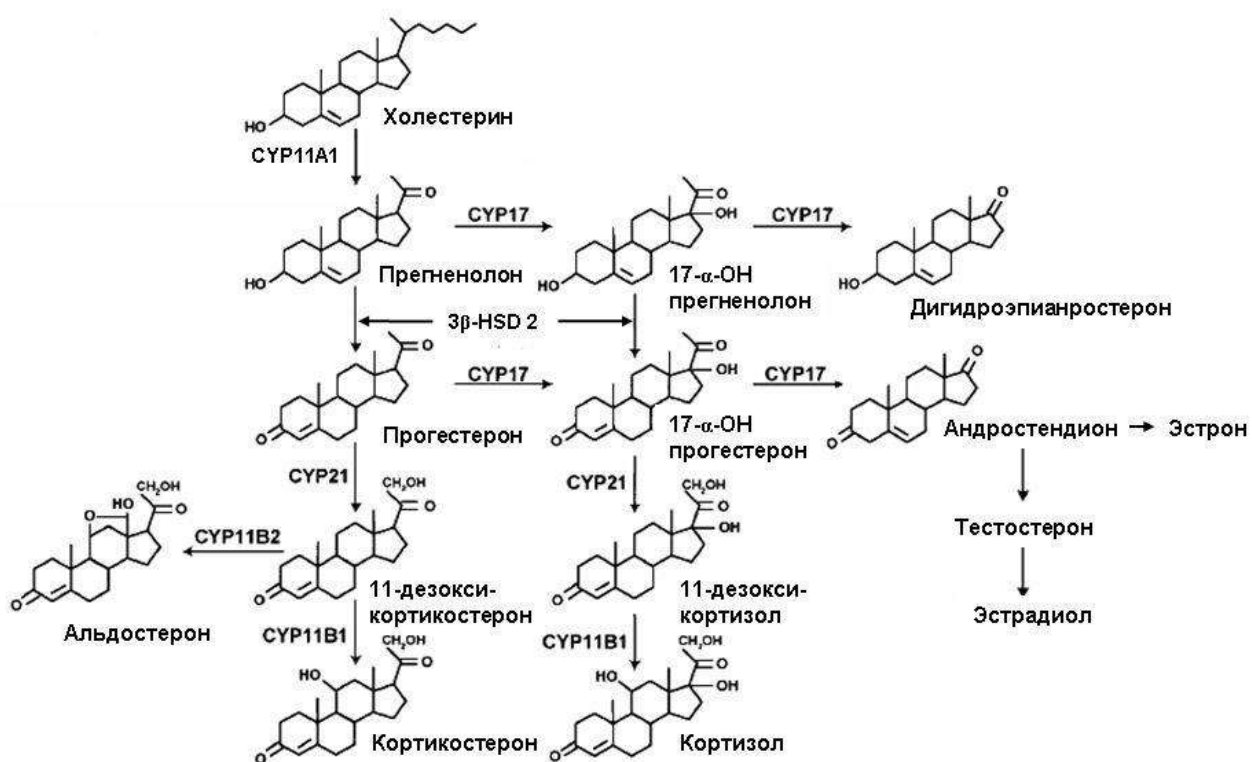


Рис. 1. Синтез стероидных гормонов в надпочечниках.

Стероидогенная активность кортикостероцитов в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза

Изучение функционального потенциала клеток клубочковой и пучковой зон плодов мышей и крыс выявило существенные различия с данными гистологических исследований коркового вещества. У мышей экспрессия CYP11a1 появляется на 11,5-12,5 сутки пренатального развития [196, 224]. Экспрессия CYP11b1 начинается на 13,5 сутки, а CYP11b2 обнаруживается в периферических участках коркового вещества перед рождением [78, 142, 165]. У крыс на

18-ые сутки пучковая зона продуцирует значительное количество глюкокортикоидов, а синтез альдостерона в клетках сформированной клубочковой зоны, наоборот, крайне низок и повышается после рождения особи [87, 179]. Исследования функциональной активности клеток клубочковой и пучковой зон у зародышей крыс на молекулярном уровне показали, что активность альдостеронсинтазы появляется позже, чем CYPb1 фактически перед рождением особи на 20-ые сутки [78]. После рождения продукция стероидных гормонов надпочечниками значительно уменьшается в течение первых двух недель [69]. На третьей неделе постнатального развития у крыс происходит активация синтеза стероидных гормонов. Между 16-ми и 20-ми сутками увеличивается секреция 17-оксипрогестерона, андростендиона и кортизола, что связано с наступлением адrenaрхе [22]. С этого момента до 50-ых суток, когда наступает гонадархе, сетчатая зона надпочечников является основным продуцентом половых гормонов. Уровень кортикостерона в кровотоке линейно увеличивается до 55-57-го дня. Изучению синтеза стероидных гормонов надпочечников в процессе старения посвящено много работ, однако их результаты очень разнятся из-за видовых и родовых различий [26, 29, 41, 53, 66, 77, 119, 176, 193, 239]. В ряде работ показано, что секреция глюкокортикоидов при стимуляции АКТГ у самцов крыс с возрастом снижается [60, 148, 205], и этот процесс не связан с уменьшением рецепторов к АКТГ, транспорта холестерина или накоплением цАМФ в клетках [38, 187], а у самок, наоборот, способна повышаться [28, 92, 149, 150, 151]. Изучение возрастных изменений в секреции минералокортикоидов показывают снижение продукции альдостерона с возрастом [27, 185].

Формирование и развитие секреторных процессов в хромаффинных клетках

На 14-ый день эмбрионального развития субпопуляция хромаффинных клеток начинает экспрессировать PNMT – фермент, определяющий скорость синтеза катехоламинов [79, 82]. Секреторная деятельность хромаффинных клеток надпочечников проходит три этапа в своем развитии [228]. Первый период начинается с 17-ых суток эмбрионального развития и характеризуется появлением норадреналин- и дофамин-синтезирующих клеток. Адреналин-

синтезирующие клетки не обнаруживаются. Второй этап начинается с 3-их суток постнатального развития. В это время в мозговом веществе появляются синтезирующие одновременно норадреналин и адреналин клетки. Третий этап характеризуется разделением клеток на норадреналоциты и адреналоциты, усилением синтеза катехоламинов в целом и повышением соотношения адреналин: норадреналин. Со второй недели постнатального развития также формируется и иннервация мозгового вещества [145]. У половозрелых крыс адреналоциты составляют 80%, норадреналоциты – около 20% [220]. Помимо катехоламинов хромаффинные клетки синтезируют нейропептиды, серотонин и гистамин [219]. Малые гранулярные клетки в мозговом веществе надпочечника у крыс очень малочисленны и составляют менее 1% [218]. Также в мозговом веществе присутствуют глиоподобные sustentakuлярные клетки [30].

Хромаффинные клетки оформляют синтезированные продукты в секреторные гранулы. Этот процесс происходит в комплексе Гольджи. Секреторные гранулы адреналоцитов и норадреналоцитов имеют различную структуру, позволяющую при электронно-микроскопическом исследовании различать эти два типа клеток. Согласно традиционным представлениям секреторные гранулы депонируются в цитоплазме и выделяют содержимое экзоцитозом при нейрогенной стимуляции. Основным механизмом выведения секреторных гранул является выделение из синапсов ацетилхолина, которое вызывает деполяризацию мембраны клетки, и увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме, влекущее за собой транслокацию секреторных гранул к плазматической мембране, прикрепление к сайтам выделения и слияние с мембраной с выделением содержимого за пределы клетки [55, 104]. Важными элементами обеспечения экзоцитоза и регуляции внутриклеточной концентрации ионов кальция являются наличие $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в плазматической мембране, а также митохондрии и ЭПС [54, 182]. Исследования методом конфокальной микроскопии показали наличие двух “субпопуляций” митохондрий в хромаффинных клетках – субплазмалеммальных и околоядерных, а также колокализацию части суб-

плазмалеммальных митохондрий с сайтами экзоцитоза, что подчеркивает роль митохондрий в выделении катехоламинов [212].

Многолетние исследования показали, что экзоцитоз не является единственным способом выделения секреторных продуктов из хромаффинных клеток. Еще в 60-ые годы прошлого века в работах В.В. Яглова было показано обводнение и растворение содержимого секреторных гранул хромаффинных клеток при экспериментальной гипогликемии, обусловленной введением инсулина [11]. В дальнейшем в работах итальянских исследователей были представлены ультраструктурные проявления данного способа выделения из хромаффинных клеток секреторных продуктов, названного ими «pease-meal degranulation» [61]. Изучение этого способа выделения секреторного материала показало, что он характерен не только для хромаффинных клеток надпочечников, но и для других типов клеток, оформляющих секрет в гранулы [12, 71, 75, 88]. Он был назван молекулярным способом выделения, так как при растворении содержимого секреторных гранул через мембрану выделяются отдельные молекулы [16].

1.8. Транскрипционная регуляция морфогенетических процессов в надпочечниках

Молекулярные и клеточные механизмы развития надпочечников на сегодняшний день мало изучены и фрагментарны. Началом исследований в этой области стало выявление в 1994 г. роли SF-1 в формировании желез, синтезирующих стероидные гормоны [128, 155, 163]. SF-1 изначально был идентифицирован как транскрипционный фактор, связывающийся с Ad4 последовательностью в промотерах генов, кодирующих ферменты стероидогенеза. Его роль заключается в развитии и дифференцировке эмбриональных клеток по пути продуцентов стероидных гормонов. У мышей с дефицитом SF-1 на 11,5-1,5 сутки пренатального развития происходит регресс зачатков надпочечников вследствие активации апоптоза [155]. Наиболее ранним регулятором развития надпочечников в эмбриональном периоде является Wilm's Tumour 1(Wt1) [235]. Его экспрессия в урогенитальной борозде у зародыша мыши обнаружи-

вается на 9,5 сутки. Ее отсутствие блокирует развитие надпочечников и гонад. В последствии было установлено, что после активации SF-1, Wt1 играет роль регулятора его экспрессии и обеспечивает стероидогенную дифференцировку [224]. Позднее было обнаружено, что экспрессии Wt1 предшествует активация в уrogenитальной борозде транскрипционного фактора Odd-Skipped related 1, необходимого для активации Wt1 [174].

Генетические исследования выявили ряд сигнальных путей, активация которых играет важную роль в пренатальном и постнатальном развитии надпочечников. Это канонический β -катенин/Wnt-сигналинг и Sonic Hedgehog-сигналинг – два ключевых пути, регулирующих пролиферацию, рост и дифференцировку клеток [226]. Последний наиболее активен в эмбриональном периоде, а после рождения особи регулирует процессы обновления и дифференцировки плюрипотентных клеток в корковом веществе в кооперации с каноническим Wnt [140, 191, 232].

Wnt (wingless-like MMTV integration site) – это семейство морфогенных сигналов, реализуемых через высоко консервативный эволюционно древний путь, участвующий в эмбриональном развитии, процессах регенерации и поддержания клеточного состава органов. Известно три пути Wnt-сигналинга: неканонические (плано-полярный и Wnt/Ca²⁺) и канонический β -катенин/Wnt-сигналинг [186, 240]. β -катенин действует как коактиватор и трансмиттер внеклеточных сигналов для активации генов-мишеней. Помимо роли транскрипционного фактора β -катенин также участвует в формировании межклеточных контактов совместно с α -катенином и E-кадгеринном. В ряде работ показано, что именно эти надмолекулярные комплексы являются мишенью для канонического Wnt, а также выявлены переключатели адгезивной и транскрипционной функции β -катенина [40, 50, 103, 115].

Механизм реализации канонического β -катенин/Wnt-сигналинга

В отсутствие Wnt β -катенин в цитоплазме содержится в крайне низких количествах из-за разрушения комплексом деструкции, состоящим из двух серин/треониновых киназ CK1 α и GSK3 β и трех супрессоров опухоли APC, ак-

сина и WTX [62]. Киназа $CK1\alpha$ фосфорилирует остаток серина-45 в молекуле β -катенина, что в свою очередь обуславливает фосфорилирование остатков серина в 33-ем и 37-ом положении киназой $GSK3\beta$ [66]. Это позволяет E3 убиквитинлигазе β -TrCP распознать молекулу β -катенина и подвергнуть ее протеасомной деградации [45]. Таким образом, создается препятствие для накопления β -катенина в цитоплазме и транслокации его в ядро (рис. 2). Связывание лигандов Wnt Frizzled-рецептором и корецептором Lrp5/6 запускает каскад реакций, приводящих к прикреплению аксина к внутриклеточному домену Lrp5/6, который фосфорилируется киназами $CK1$ и $GSK3\beta$ [17, 56]. Комплекс деструкции секвестрируется на плазматической мембране, что препятствует фосфорилированию β -катенина. Стабилизированный β -катенин проникает в ядро, где снимает репрессоры Groucho/TLE с транскрипционных факторов LEF/TCF и запускает транскрипцию генов Wnt-сигнального пути (рис. 2) [76, 168].

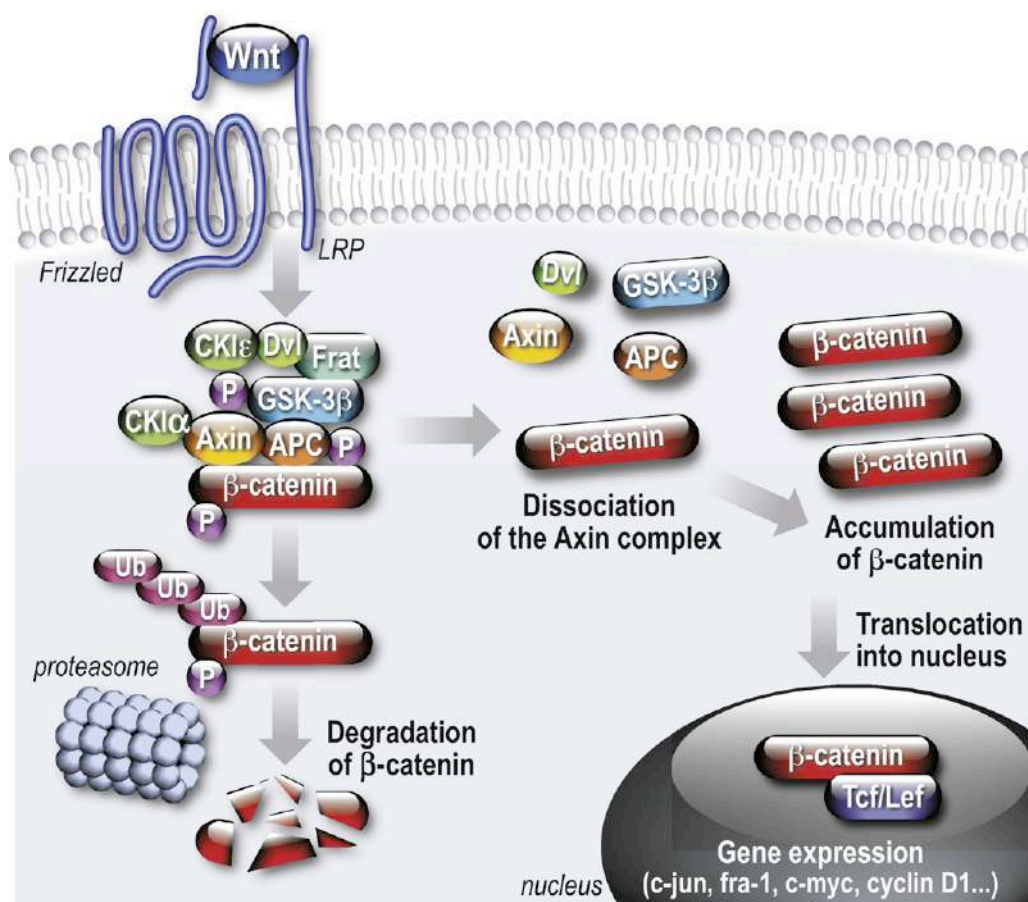


Рис. 2. Канонический β -катенин/Wnt-сигналинг. По данным работы 95.

Маркером активации канонического β -катенин/Wnt-сигналинга является ядерная локализация β -катенина [44, 95]. На сегодняшний день известно порядка 130 генов, регулируемых каноническим Wnt-сигналингом. В большинстве случаев он активирует их транскрипцию, а ингибирующее воздействие установлено для 12 генов, кодирующих E-кадгерин, костные морфогенетические белки, остеокальцин, периостин и др. [186].

Роль канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в развитии надпочечников

Транскрипционно активный β -катенин обнаруживается в адреногенитальном зачатке, а затем в развивающемся надпочечнике [203]. Его полная инактивация на 12,5 сутки эмбрионального развития мыши приводит к резкому снижению темпов пролиферации и дифференцировки, что проявляется уменьшением экспрессии SF-1, CYP11a и 3β -гидроксистероиддегидрогеназы и исчезновению большей части надпочечника к 18,5 суткам, что свидетельствует об участии канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в активации и поддержании пролиферативных процессов на ранних стадиях развития органа [44].

В постнатальном развитии канонический Wnt участвует в поддержании пула прогениторных клеток и клеточного гомеостаза в корковом веществе, о чем свидетельствуют данные, полученные на мышах с мутациями гена β -катенина [141, 226]. У мышей в возрасте 30-ти недель в корковом веществе обнаруживается усиление апоптоза, появляются признаки дезорганизации цитоархитектоники, снижается экспрессия стероидогенных маркеров, на 45-ой неделе корковое вещество истончается [113].

Несомненна роль канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в формировании зональности коркового вещества. Имеющиеся данные показывают, что дифференцировка прогениторных клеток в клетки клубочковой зоны происходит при непосредственном участии этого сигнального пути [20]. По имеющимся данным, канонический β -катенин/Wnt-сигналинг усиливает синтез альдостерона, повышая экспрессию рецептора ангиотензина, который в свою очередь активирует продукцию CYP11b2 [44]. Менее изучена роль Wnt-сигналинга в формировании пучковой и сетчатой зон. Имеются сведения, что

дифференцировка в клетки пучковой зоны, вероятно, требует репрессии канонического β -катенин/Wnt-сигналинга и активации протенкиназного A сигнала [195]. По данным Walczak E. с соавт. активация канонического β -катенин/Wnt-сигналинга подавляет экспрессию CYP11a1, CYP11b1, Star и SF-1 в клетках пучковой зоны, что вызывает снижение синтеза кортикостерона [233].

Помимо канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в развитии коркового вещества показана роль и других сигнальных молекул, в частности основного фактора роста фибробластов, чья экспрессия в корковом веществе у половозрелых крыс практически идентична каноническому β -катенин/Wnt-сигналингу [120]. Связь сигнальных молекул с активацией канонического Wnt подчеркивает значимость этого пути в пренатальном и постнатальном морфогенезе коркового вещества. В 90-е годы прошлого века был выявлен еще один транскрипционный фактор, сопряженный с каноническим Wnt-сигналингом, – PRH/Nhex.

PRH/Nhex – богатый пролином гомеодомен или экспрессируемый гемопоэтическими клетками гомеодомен. Впервые он был открыт в гемопоэтических клетках человека и птиц, отсюда и получил свое название [127]. PRH/Nhex – транскрипционный фактор, регулирующий развитие сердца, печени, тимуса, щитовидной железы и переднего мозга в эмбриональном периоде [18, 208]. Основная роль Nhex заключается в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток путем подавления транскрипции ряда генов, таких как эндотелиально-клеточная специфичная молекула 1, фактор роста эндотелия сосудов A и его рецептор, хордин и др., и активации транскрипции эндоглина [118, 183, 184, 242]. В постнатальном развитии Nhex экспрессируется многими клетками эндодермального и мезодермального происхождения, особенно миелоидными клетками. Роль Nhex в постнатальном развитии нервной системы заключается в подавлении роста аксонов нейронов в центральной нервной системе после травмы. В нейронах периферической нервной системы экспрессия Nhex практически не выявляется [215].

Роль Nhex в регуляции тканевого гомеостаза в корковом веществе надпочечников крайне мало изучена. Фактически, в единственной работе Ту-

czewska M. с соавт., изучавшими экспрессию генов, контролирующих пролиферацию в корковом веществе в процессе регенерации, показано снижение экспрессии *Nhex* [101].

Регуляция морфогенетических процессов в мозговом веществе надпочечников

Исследования экспрессии различных генов позволили выделить молекулы, которые инициируют эндокринный фенотип симпатoadреналовых клеток. *Dlk1*, член семейства эпидермального фактора роста и Notch лиганд [143], широко представлен на ранних стадиях развития млекопитающих, но его экспрессия становится ограниченной на поздних стадиях [84]. *Dlk1* мРНК экспрессируется в симпатoadреналовых клетках сразу после их заселения в дорсальную аорту и быстро подавляется в предшественниках симпатических нейронов, но сохраняется у предшественников хромаффинных клеток [122]. Хотя многие годы предполагалось, что *dlk1* играет роль в дифференциации хромаффинных клеток, пока этим данным нет экспериментального подтверждения.

Раннее развитие хромаффинных клеток и симпатических нейронов зависит от специфических факторов транскрипции, включая *Phox2b* [209], *Ascl1* [67, 81], *Hand2* [65, 167], *Gata2/3* [110, 207], *AP-2 β* [214], *Islet-1* [210] и *Insm-1* [131]. За исключением *AP-2 β* , который обнаруживается при миграции клеток нервного гребня, экспрессия этих генов инициируется вскоре после того, как клетки агрегируются в дорсальной аорте в ответ на локальный сигнал BMP-2/4/7 (костные морфогенетические белки, bone morphogenetic protein) [123].

Phox2b – фактор транскрипции гомеодомена, который связан с развитием норадренергических фенотипов клеток [209] и висцеральных рефлекторных путей [181], был идентифицирован как главный регулятор развития симпатoadреналовых клеток. В его отсутствие развитие как хромаффинных клеток, так и симпатических нейронов полностью блокируется [124]. Все остальные компоненты симпатoadреналовой транскрипционной сети имеют различные функции, определяющие развитие клеток, включая норадренергическую, нейронную и эндокринную дифференцировку, регуляцию пролиферации и клеточную гибель. Хотя предшественники хромаффинных клеток и симпатических нейро-

нов имеют в основном идентичный набор факторов транскрипции в процессе их раннего развития, некоторые из этих факторов обладают различным уровнем экспрессии и их функции могут быть не одинаковыми для этих типов клеток.

На сегодняшний день данных о роли Wnt-сигналинга в развитии симпатических ганглиев и хромаффинных клеток в пренатальном и постнатальном периодах мало [42] и их трудно обобщить.

Известно, что Wnt-сигналинг участвует в инициации и поддержании клеток нервного гребня в процессе нейруляции [201], а также миграции клеток нервного гребня в вентральные части зародыша [116, 230]. Прекращение Wnt-сигналинга в клетках нервного гребня приводит к отсутствию развития среднего и частично заднего мозга, уменьшению числа чувствительных нейронов и меланоцитов, утрате шванновских клеток, то есть предшественников хромаффиноцитов мозгового вещества [130,131, 147]. В постнатальном развитии роль Wnt пути в хромаффинных клетках не изучена. Однако, хромаффинные клетки надпочечников, как другие типы эндокринных клеток, развиваются в непосредственной близости от хорошо развитой сети капилляров, необходимой для выделения продуцируемых ими гормонов [48]. Показано, что клетки феохромоцитомы крысы подвергаются хромаффинноподобной дифференцировке, когда культивируются с эндотелиальными клетками надпочечников [178]. Известно, что Wnt-сигналинг играет важную роль в формировании микроциркуляторного русла, а также поддержании его целостности и снижении проницаемости, что дает возможность косвенно регулировать развитие и поддержание популяции хромаффинных клеток [100].

Также практически отсутствуют сведения об участии PRH/Hhex в морфогенезе мозгового вещества. Имеются данные о нарушениях эмбрионального развития переднего мозга у PRH-нокаутных мышей и ингибирующее влияние PRH/Hhex на развитие центральной нервной системы, свидетельствующие о роли этого транскрипционного фактора в пренатальном и постнатальном развитии производных нейроэктодермы, в частности, передней части нервной

трубки [208]. Роль Nhex в постнатальном развитии нервной системы заключается в подавлении роста аксонов нейронов в центральной нервной системе после травмы, в нейронах периферической нервной системы экспрессия Nhex не была выявлена [215].

Заключение

Анализ имеющихся данных по развитию и становлению эндокринной функции надпочечников показывает, что у крысы корковое и мозговое вещество к моменту рождения особи анатомически и функционально сформированы. После рождения стероидогенная активность коркового вещества снижается, а мозгового продолжает развиваться благодаря изменению активности PNMT. Следовательно, воздействие на надпочечники зародыша различных химических соединений, обладающих свойствами эндокринных дисрапторов, способно не только повлиять на основные морфогенетические процессы, такие как пролиферация, апоптоз и дифференцировка, начало и скорость протекания этих процессов. Способность некоторых дисрапторов оказывать гормоноподобное действие за счет структурного сходства с молекулами эндогенных гормонов может существенно изменять течение морфогенетических процессов, особенно если дисраптор способен имитировать действие стероидных гормонов, имеющих рецепторы в ядре и непосредственно регулирующих транскрипцию различных генов. Однако регуляция гистогенеза в целом является еще мало изученной, и работы по воздействию эндокринных дисрапторов на развивающийся организм могут также внести значительный вклад в установление путей регуляции как пренатального, так и постнатального морфогенеза органа.

1.9. Современное состояние проблемы эндокринных дисрапторов

Воздействие химических веществ окружающей среды на организм длится в течение всей жизни, создавая так называемую химическую нагрузку. Некоторые из эндокринных дисрапторов являются стойкими и способными к биоаккумуляции веществами. Результаты анализов крови, мочи, жировой и других тканей человека убедительно показывают присутствие различных эндо-

кринных дисрапторов в организме людей, проживающих во всех регионах мира. Основными источниками дисрапторов являются продукты питания, вода, атмосфера [241]. Жировая ткань является своеобразным депо эндокринных дисрапторов, поскольку многие из них липофильны.

Впервые проблему эндокринных дисрапторов поставило Американское общество эндокринологов. Общество провело свое первое открытое заседание по дисрапторам в 2005г. А научный доклад Американского общества эндокринологов, сделанный в 2009 г. стал первым общественным заявлением по этой проблеме со стороны одного из ведущих международных медицинских обществ [99]. К тому времени, члены Американского общества эндокринологов пришли к выводу, что имеется достаточная доказательная база, чтобы сделать вывод о риске для здоровья человека, связанном с химическими веществами, нарушающими работу эндокринной системы. Документы, впоследствии опубликованные Американским обществом эндокринологов, как Положение о «Принципах по химическим веществам, нарушающим работу эндокринной системы и защите здоровья населения» от 2012г., письма в Европейскую комиссию (март 2013г.) и в Секретариат Стратегического подхода к международному регулированию химических веществ (июнь 2013 г.), призывающие к введению научно обоснованного подхода по эндокринным дисрапторам, дополнительно способствовали повышению информированности об этих веществах и улучшению понимания проблемы [91].

После доклада Американского общества эндокринологов в 2009г., увеличилось количество медицинских обществ, выражающих обеспокоенность проблемой эндокринных дисрапторов, а параллельно с этим увеличилось и количество публикаций, указывающих на негативные воздействия химических веществ, которые влияют на действие гормонов. В США Американская медицинская ассоциация – крупнейшая организация профессиональных медиков, в ноябре 2009г. приняла Правила (D-135.982, Регулирование химических веществ, нарушающих работу эндокринной системы), направленные на улучшение контроля за химическими веществами, нарушающими работу нервной си-

стемы, основываясь на всесторонних данных, охватывающих как низкоуровневую, так и высокоуровневую экспозицию, и призвала к «основывающемуся на принципе предосторожности уменьшению экспозиции химических веществ, нарушающих работу эндокринной системы американского населения». Американское химическое общество в 2012-2015гг. неоднократно выступало с заявлениями по тестированию химических веществ [91], на предмет выявления их воздействия на эндокринную систему, рекомендуя расширение образовательных программ и увеличение количества исследований, обновление протоколов тестирования и разработку более безопасных альтернатив для дисрапторов.

В 2013г. Всемирная организация здравоохранения и Программа ООН по окружающей среде (UNEP) выпустили совместный доклад по состоянию науки об эндокринных дисрапторах [198]. В этом докладе рассматривается современный уровень представлений о дисрапторах и об их воздействии на здоровье человека; в нем также рекомендуется усовершенствовать тестирование и сократить экспозицию дисрапторов. Также в 2013г. Collegium Ramazzini – международная академия признанных экспертов в области гигиены окружающей среды и профессиональных болезней, выпустила заявление по эндокринным дисрапторам в Европейском Союзе, призывая расширить перечень задач Регламента Европейского союза, и давать более полную оценку всех научных данных при принятии решения по вопросам регулирования химических веществ. В том же 2013г. большая группа независимых ученых выпустила Берламонтскую декларацию, в которой они призывали Европейскую комиссию усовершенствовать свой режим регулирования для этих химических веществ. Эту декларацию подписали около 100 ученых из 19 стран, включая несколько стран-членов Европейского Союза, Китай, Чили, Мексику, ЮАР.

Британский Королевский колледж акушерства и гинекологии издал в 2013 г. Научный доклад о воздействии химических веществ в период беременности, целью которого было информирование беременных женщин или кормящих матерей об источниках и путях химической экспозиции, давая возможность им минимизировать вред для их еще не родившихся детей» [43], а Меж-

дународная конференция по здоровью детей и окружающей среде выпустила в 2013 г. Иерусалимское заявление о своей «приверженности делу защиты здоровья детей от опасных факторов окружающей среды» [91].

В декабре 2014г. Международное общество эндокринологов и некоммерческая международная организация IPEN выпустили совместный документ, отражающий современное состояние проблемы эндокринных дисрапторов как в общественном, так и научном плане [91]. Наиболее значимыми частями этого обзора стали раздел о воздействии эндокринных дисрапторов на будущие поколения и о необходимости выработки новой научной парадигмы для оценки их риска. Авторы привели данные о передаче химической нагрузки последующим поколениям. Помимо собственной экспозиции в течение своей жизни, человек получает еще унаследованную экспозицию эндокринных дисрапторов от своих родителей. Например, во время беременности некоторые химические вещества из жировой ткани матери могут преодолевать плацентарный барьер и влиять на развивающийся плод [243]. Некоторые эндокринные дисрапторы обнаруживаются в грудном молоке [206]. Кроме того, были приведены доказательства того, что эндокринные дисрапторы могут вызывать изменения в гонадах, из которых впоследствии образуются женские (яйцеклетки) и мужские (сперматозоиды) половые клетки, а это означает, что последствия такого воздействия будут наследоваться не только детьми, но также и внуками, правнуками и т.д. Это подчеркивает тот факт, что если синтезируемое химическое вещество попадает в окружающую среду и способно влиять на гонациты и половые клетки, то результаты его воздействия будут еще долго проявляться, даже после удаления или распада этого вещества [47, 204, 223].

Важным прорывом в методологических подходах к изучению эндокринных дисрапторов стало осознание несостоятельности токсикологических подходов и, соответственно, необходимости отказа от определения пороговых доз и необходимости разделения токсических и дисрапторных проявлений действия химических соединений, обусловленных дозой воздействия. Гормоны действуют в диапазоне концентраций от нг/мл до пг/мл. Соответственно, без-

опасной дозы у эндокринных дисрапторов быть не может, а их изучение должно проводиться при крайне низких уровнях воздействия, соответствующих фоновому воздействию на организм. В настоящее время таких низкодозовых исследований крайне мало.

ДДТ – самый распространенный эндокринный дисраптор

ДДТ - это хлорорганический инсектицид, который интенсивно применялся во всем мире в 1940-60-х гг. Его использовали для борьбы с насекомыми в сельском хозяйстве, в быту, общественных местах и в учреждениях. Из-за токсичности ДДТ и химической стойкости в 1970-е годы многие страны запретили его применение. Несмотря на это, ДДТ по-прежнему активно применяется, особенно в Индии и в Африке, для борьбы с насекомыми - переносчиками заболеваний человека, таких как малярия, лейшманиоз, лихорадка денге и болезнь Чагаса.

Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях (СОЗ), которую приняли в 2001 г. и сейчас уже ратифицировали 179 стран, была направлена на ограничение глобального применения ДДТ для борьбы с переносчиками заболеваний в соответствии с указаниями ВОЗ. Хотя целью было сократить, а в конечном итоге прекратить все виды применения ДДТ, глобальное применение существенно не изменилось после вступления Стокгольмской конвенции в силу [112]. Более того, несмотря на ограничение применения ДДТ только борьбой с переносчиками заболеваний, данные мониторинга указывают, что до сих пор происходит сельскохозяйственное применение в таких странах как Индия, Эфиопия и Гана [31, 102, 111, 160].

По состоянию на декабрь 2013 г., к странам, которые уведомили о своих намерениях использовать ДДТ в соответствии со Стокгольмской конвенцией, относились: Ботсвана, Эритрея, Эфиопия, Индия, Мадагаскар, Маршалловы острова, Маврикий, Марокко, Мозамбик, Намибия, Сенегал, ЮАР, Свазиленд, Уганда, Венесуэла, Йемен и Замбия. Мьянма отозвала свое уведомление о применении ДДТ, а Китай уведомил о прекращении производства и приме-

ния. Эфиопия, Индия и Намибия уведомили о фактическом или предполагаемом производстве ДДТ [91].

Большинство людей во всем мире до сих пор подвергаются экспозиции ДДТ через продукты питания. ДДТ накапливается в животных жирах, так что к продуктам питания, которые часто содержат наиболее высокие уровни ДДТ, относятся мясо, рыба, птица, яйца, сыр, масло и молоко. ДДТ остается широко распространенным загрязнителем продуктов питания, и его уровни могут быть довольно значительными в местах, где продолжается производство и применение ДДТ, а также в местах, где его производили ранее [72, 231]. В Российской Федерации действовали санитарные правила и нормы, регламентирующие максимально допустимые уровни ДДТ в продуктах питания [2]. В дальнейшем они были заменены Техническим регламентом Таможенного союза [10].

Содержание ДДТ в организме детей всегда выше, чем у взрослых, проживающих в тех же местах, независимо от того, проживают ли они на территориях, где ДДТ активно применяют [102], или же в странах, где ДДТ был давно запрещен [211]. Экспозиция ДДТ может начинаться уже в период внутриутробного развития (передача через плаценту) или с грудным молоком [49]. Как показывают данные исследований Программы ООН по окружающей среде и ВОЗ за 2001- 2013 гг., высокие уровни ДДТ в грудном молоке были зафиксированы в таких странах как Эфиопия (2013), Таджикистан (2009), Соломоновы острова (2011), Индия (2009), Гаити (2005), острова Тихого океана (2011), Гонконг (2002), Маврикий (2009), Мали (2009), Молдова (2009), Того (2010), Уганда (2009), Фиджи (2002), Судан (2006), Филиппины (2002), Украина (2001), Джибути (2011), Кот д'Ивуар (2010) и в других (страны перечисляются в порядке уровней ДДТ) [91, 134].

В организме людей пожилого возраста обычно наблюдаются также более высокие уровни ДДТ, поскольку ДДТ накапливается в течение всей жизни, да и в силу того, что уровни экспозиции в прошлом во многих странах были гораздо выше, чем сейчас. На самом деле, возраст часто является наиболее значимым фактором, определяющим уровни ДДТ в организме [93]. Например,

среди населения, проживающего неподалеку от старого завода по производству ДДТ, средний уровень ДДТ для взрослых составил 159 нг/мл сыворотки крови, тогда как для лиц старше 70 лет средний уровень составлял 350 нг/мл [72]. Это повышает вероятность того, что пожилые люди, у которых также имеется и более тяжелый фон хронических заболеваний, могут обладать более высокой чувствительностью к накопившемуся в организме ДДТ, чем молодые люди, и это следует учитывать при работе с населением, подверженным воздействию ДДТ.

Стойкость ДДТ к биодegradации обуславливает высокие уровни ДДТ в организме человека даже в тех странах, где ДДТ был давно запрещен. Для того чтобы концентрация ДДТ в организме человека сократилась вдвое, требуется от четырех до 10 лет [152]. Следовательно, хотя мониторинговые исследования и установили, что запрет ДДТ привел к сокращению экспозиции населения, уровни ДДТ в организме человека могут оставаться высокими еще много лет [211].

Повышенная экспозиция ДДТ и его метаболитов наблюдается в приполярных странах, поскольку эти химические вещества относительно летучие и подвергаются переносу на большие расстояния - т.е. они попадают в атмосферу в более теплых регионах и выпадают на поверхность земли в более холодных. В действительности, уровень поступления ДДТ для эскимосов приближается к уровню поступления для жителей стран, проживающих в регионах, где ДДТ применяют для борьбы с малярией [188].

По некоторым данным прогнозируемого изменения климата предсказывается, что экспозиция ДДТ в ближайшие десятилетия будет расти. Предполагается, что изменение климата приведет к повышению заболеваемости малярией, что потенциально может привести к повышению спроса на ДДТ и к расширению его применения [189]. Дополнительными источниками выделения ДДТ являются тающие морские льды и вечная мерзлота [156, 161]. Изменение климата также усиливает выделение СО₂ из воды и почв в атмосферу, а более высокие скорости ветра приведут к усилению воздушного переноса. Поскольку

ДДТ накапливается на вершине пищевой цепи до уровней в тысячи раз выше, чем в ее нижней части, и в сотни тысяч раз выше, чем в воде, то вполне вероятно, что выделение ДДТ из тающих ледников приведет к повышению концентраций ДДТ в организме людей, которые находятся наверху арктической пищевой цепи.

1.10. Влияние ДДТ на гистофизиологию надпочечных желез

ДДТ был одним из первых признанных эндокринных дисрапторов, действующих на эндокринную и репродуктивную системы.

История изучения влияния ДДТ на надпочечные железы началась в 40-е годы прошлого века. В экспериментальных работах на различных видах животных было исследовано действие ДДТ на структурные и функциональные показатели коркового вещества надпочечников. Необходимо отметить, что все эти исследования касались только оценки токсичных, а часто и сублетальных доз. В экспериментах на собаках была выявлена способность метаболита ДДТ ТДЭ (1,1'-(2,2-дихлоэтилиден)-бис [4-хлорбензола]) вызывать дегенерацию, гибель клеток и атрофию коркового вещества [73, 171], однако дальнейшие исследования показали, что эти эффекты характерны только для собак, в то время как у крыс, мышей, кроликов и обезьян подобные проявления не наблюдались [94]. Изучение дозозависимых эффектов у собак показало, что существует пороговая доза, ниже которой реакция не развивается. Это является веским доказательством того, что некроз коркового вещества при воздействии метаболитов ДДТ – это токсический, а не дисрапторный эффект. Исследования *o,n'*-ДДТ показали, что доза 50 мг/кг вызывает вакуолизацию цитоплазмы и гиперхроматоз ядер клеток пучковой зоны у собак, но синтез кортикостероидов при этом не блокируется [68]. Таким образом, было установлено, что действие токсичных доз *o,n'*-ДДТ иное, чем ТДЭ, хотя их метаболизм частично протекает одинаково. Предпринимались попытки применять изомеры ТДЭ для лечения гиперкортицизма и опухолей надпочечников у человека. Вводимая доза варьировала от 7 до 285 мг/кг/сут, но терапевтический эффект развивался, начиная с дозы в 100мг/кг/сут, вводимой в течение многих недель [4]. Подобное лечение

сопровождалось тяжелыми соматическими и психическими расстройствами, которые регрессировали после прекращения введения препаратов.

Изучение влияния метилсульфониловых производных ДДТ на надпочечники, проводившееся исследователями Уппсальского университета (Швеция), в онтогенетическом аспекте показало наличие трансплацентарной цитотоксичности при воздействии в дозе 25 мг/кг, проявлявшейся дегенерацией митохондрий и вакуолизацией клеток пучковой зоны у плодов крыс [137], а также аналогичные изменения у 2-дневного потомства при воздействии дозы в 50 мг/кг [23]. Исследователями был предложен механизм действия данных веществ, заключающийся во взаимодействии с цитохромом Р-450 11 β -стероидгидроксилазы [23, 136]. В дальнейшем было показано, что цитохром Р-450 11 β -стероидгидроксилазы участвует в метаболизме производных ДДТ [154], что может быть одним из механизмов дисрапторного действия ДДТ на кортикостероциты.

Исследований, посвященных влиянию ДДТ и его производных на клубочковую и сетчатую зоны, крайне мало, и они зачастую противоречивы. Так, в одних исследованиях показаны снижение продукции альдостерона при воздействии *o,n*-ДДД и метилсульфонил-ДДЭ и увеличение синтеза андростендиона при воздействии метилсульфонил-ДДЭ, но не *o,n*-ДДТ [36], в то время как в других исследованиях установлено, что данные вещества при инкубации со срезами надпочечников не связываются ни с клетками клубочковой зоны, ни с клетками мозгового вещества [146]. Эти результаты противоречат ранее полученным данным о механизмах действия ДДТ как инсектицида. Известно, что он относится к веществам нейропаралитического действия и оказывает влияние, как на нейроны, так и клетки глии, которые присутствуют в мозговом веществе [117]. Рядом исследователей предпринимались попытки связать воздействие ДДТ на организм с развитием болезни Паркинсона, основанные на более высоком содержании метаболитов ДДТ в тканях мозга умерших, страдавших данным заболеванием [59, 180, 213]. В экспериментах *in vitro* было установлено, что метаболиты ДДТ в субтоксичных дозах повышают выделение

дофамина из синапсом и снижают его обратный захват за счет снижения мембранного транспортера дофамина, а также подавления везикулярного транспортера моноаминов в линии клеток нейрогенного происхождения [83]. Дисрапторные эффекты ДДТ и его производных на гистофизиологию хромофинных клеток не изучены.

Заключение

Анализ литературных данных показывает, что воздействие эндокринных дисрапторов на организм неуклонно возрастает. Длительное и массивное употребление ДДТ в прошлом и возврат к его использованию в 21-м веке обуславливает его повсеместное распространение и воздействие на организм в настоящее время и в последующие десятилетия. Несмотря на большое количество работ, посвященных действию токсичных и субтоксичных доз этого пестицида на надпочечники, единого представления о влиянии ДДТ на гистофизиологию как коркового, так и мозгового вещества не существует, как и влияния на развитие железы в целом. Исследований действия ДДТ как эндокринного дисраптора, а не токсичного вещества, на эндокринные железы крайне мало. В первую очередь это обусловлено методологическими проблемами изучения дисрапторов, а именно необходимостью отказа от токсикологических понятий и подходов, дифференцировки токсичных и дисрапторных эффектов, и проведению исследований в низких дозах, аналогичных физиологическим дозам эндогенных гормонов. Такого рода исследования влияния ДДТ на надпочечные железы как взрослого, так и развивающегося организма не проводилось, что и обусловило необходимость проведения фундаментального исследования по развитию и функционированию надпочечников в условиях постоянного воздействия низких доз ДДТ на организм и в пренатальном, и в постнатальном периоде развития, а также комплексной оценке морфогенетических процессов и в корковом, и в мозговом веществе как в норме, так и при воздействии дисраптора.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Исследование выполнено на 98 самцах крысах Вистар, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»).

Уход за животными, содержащимися в виварии, осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003г. №267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999г.

Эксперимент проведен в соответствии с правилами работы с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. На проведение эксперимента получено разрешение этического комитета ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол № 8а от 06.10.2011г.).

Моделирование воздействия эндокринного дисраптора на развивающийся организм

Моделировали воздействие ДДТ, аналогичное воздействию на развивающийся организм человека в пренатальном и постнатальном развитии, включая воздействие в течение внутриутробного периода, подсосного периода и потребления ДДТ при переходе на самостоятельное потребление корма.

Половозрелые самки (n=13) и самцы (n=13) крыс были ссажены попарно. С первых суток с момента ссаживания крысам опытной группы заменили водопроводную воду на раствор о,п-ДДТ («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 20 мкг/л. Самки крыс потребляли раствор ДДТ вместо воды в течение всего срока беременности, а также периода лактации (21 день).

Объектом исследования являлось потомство крыс. Интактных самок после рождения потомства разделили на две группы. Первая подгруппа самок продолжала потреблять водопроводную воду, а второй подгруппе водопроводную воду заменили на раствор ДДТ той же концентрации. На 22-ые сутки потомство было отсажено в отдельные клетки, где они самостоятельно потребляли водопроводную воду или раствор ДДТ. Животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила в возрасте 42 суток и 70 суток с 9 до 11ч. по московскому времени. Таким образом, были сформированы 6 групп, названия которых и численность животных представлены в табл. 1. Для исследования использовали потомство мужского пола.

Табл. 1.

Характеристика групп экспериментальных животных

№ п/п	Воздействие	Название группы	Количество животных
1.	Контрольные животные в возрасте 42-х суток	P42	12
2.	Воздействие ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах до 42-х суток	ДДТ E0-P42	12
3.	Воздействие ДДТ в постнатальном периоде до 42-х суток	ДДТ P0-P42	12
4.	Контрольные животные в возрасте 70-ти суток	P70	12
5.	Воздействие ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах до 70-х суток	ДДТ E0-P70	12
6.	Воздействие ДДТ в постнатальном периоде до 70-х суток	ДДТ P0-P70	12

Итого:	72
--------	----

Обоснование сроков исследования

Выбор сроков исследования обусловлен возрастной физиологией. 42-ые сутки соответствуют пубертатному периоду, сопровождающемуся активацией секреторных процессов во всех зонах коркового вещества надпочечников, а также периоду между адренархе и гонадархе, то есть моменту развития, когда в сетчатой зоне происходит синтез основного количества половых стероидов, а активная секреция тестостерона, начинающаяся на 50-ые сутки, еще не наступила [22]. 70-ые сутки – это постпубертатный период, когда надпочечник крысы достигает максимума своего морфологического и функционального развития [22].

Обоснование и расчет потребленных доз ДДТ

Воздействие низких доз ДДТ на организм проводили с учетом следующих требований:

- соответствие количества ДДТ, потребляемого в сутки, при пересчете на объем циркулирующей крови, концентрации эндогенных гормонов;
- потребления ДДТ человеком с продуктами питания в соответствии с нормативами Технического регламента Таможенного союза 021/2011 [10];
- особенностей метаболизма ДДТ в организме крысы по сравнению с человеком [125].

Для определения потребления ДДТ беременными и лактирующими самками крыс, а также самостоятельного потребления потомством, проводили ежедневный учет потребления раствора ДДТ, а также массометрию животных. Параметры потребления ДДТ крысами представлены в таблице 2.

Корм для лабораторных животных и водопроводную воду предварительно исследовали на наличие ДДТ, его метаболитов и структурно сходных соединений методом газожидкостной хроматографии в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве».

Табл. 2.

Среднесуточное потребление ДДТ животными в эксперименте

Экспериментальные животные	Потребление ДДТ, мкг/кг/сут
Беременные самки	2,69±0,18
Лактирующие самки	2,47±0,17
Потомство E0-P70	2,90±0,12
Потомство P0-P70	3,71±0,15

Забор исследуемого материала

Проводили двустороннюю адреналэктомию и забор крови из магистральных сосудов. Определяли массу тела животных и массу надпочечников. Надпочечники фиксировали в растворе Буэна. Из цельной крови получали ЭДТА-плазму и сыворотку.

Изготовление гистологических препаратов и светооптические исследования

Зафиксированные надпочечники были разрезаны на две половины. Разрез производили через максимальный диаметр органа. Надпочечники прошли стандартную гистологическую проводку с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jr» («Hygesc», Франция) и были залиты в парафин. Экваториальные срезы изготавливали с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия) и после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином («Biovitrum», Россия).

Изучение гистологических препаратов надпочечников проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Leica DM2500» и компьютерной морфометрии с помощью программы «ImageScore» («Leica Microsystems», Германия).

Определяли следующие морфометрические параметры:

1. Диаметр надпочечника, мкм.
2. Толщина коркового вещества, мкм.

3. Площадь коркового вещества, мкм^2 .
4. Доля площади коркового вещества, %.
5. Площадь мозгового вещества, мкм^2 .
6. Площадь клубочковой зоны, мкм^2 .
7. Площадь пучковой зоны, мкм^2 .
8. Площадь сетчатой зоны, мкм^2 .
9. Площадь промежуточной зоны, мкм^2 .
10. Доля площади клубочковой зоны в корковом веществе, %.
11. Доля площади пучковой зоны в корковом веществе, %.
12. Доля площади сетчатой зоны в корковом веществе, %.
13. Доля площади промежуточной зоны в корковом веществе, %.
14. Количество кортикостероцитов в мм^2 сетчатой зоны.
15. Общее количество кортикостероцитов в срезе сетчатой зоны.
16. Площадь кортикостероцита клубочковой зоны, мкм^2 .
17. Площадь среза ядра кортикостероцита клубочковой зоны, мкм^2 .
18. Площадь кортикостероцита пучковой зоны, мкм^2 .
19. Площадь среза ядра кортикостероцита пучковой зоны, мкм^2 .
20. Площадь кортикостероцита сетчатой зоны, мкм^2 .
21. Площадь среза ядра кортикостероцита сетчатой зоны, мкм^2 .
22. Диаметр капилляров клубочковой зоны, мкм .
23. Диаметр капилляров пучковой зоны, мкм .
24. Диаметр капилляров сетчатой зоны, мкм .
25. Общая площадь хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества, мкм^2 .
26. Доля хромаффинных клеток в площади мозгового вещества, %.
27. Площадь хромаффинной клетки, мкм^2 .
28. Площадь среза ядра хромаффинных клеток, мкм^2 .

Иммуногистохимические исследования

Для выявления транскрипционных факторов, регулирующих морфогенез надпочечников, проводили исследование активации канонического Wnt/ β -

катенин-сигналинга – ключевого механизма поддержания клеточного состава органов [186], а также транскрипционного фактора PRH/Nhex, являющегося регулятором пролиферации клеток [118], но малоизученных в постнатальном развитии надпочечников.

Иммуногистохимическое выявление β -катенина в эндокриноцитах коркового вещества надпочечников проводили с помощью моноклональных антител («Cell Marque», США) в разведении 1:400. Подсчитывали количество кортикостероцитов и хромаффинных клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной вариантами локализации β -катенина и выражали их в виде процентов от общего числа клеток в пучковом и сетчатом слоях и мозговом веществе и в виде абсолютного количества иммунопозитивных клеток в мм² среза клубочковой зоны в связи с ее сложной трехмерной организацией. Активацию канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга оценивали по накоплению β -катенина в цитоплазме и транслокации его в ядро [44, 203].

Для изучения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Nhex использовали поликлональные антитела к Nhex («Abcam» США) в разведении 1:8000. Подсчитывали количество иммунопозитивных клеток и выражали их в виде процентов от общего числа кортикостероцитов в пучковом и сетчатом слоях, хромаффинных клеток, и в виде абсолютного количества иммунопозитивных кортикостероцитов в 1мм² среза клубочковой зоны.

Для определения пролиферативной активности клеток использовали поликлональные антитела к Ki-67 («Cell Marque», США) в разведении 1:100. Количество Ki-67-позитивных клеток выражали в процентах в пучковой и сетчатой зонах и в количестве клеток в мм² среза клубочковой зоны в связи с особенностями трехмерной структуры.

Для проведения иммуногистохимических исследований парафиновые срезы надпочечника помещали на стекла с адгезивным покрытием «Superfrost Plus» («Menzel», Германия). Иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с протоколами производителей антител. Для проявления иммунопероксидазной реакции использовали набор реактивов «UltraVision LP detec-

tion system» («ThermoFisher Scientific», США). Предварительно реактивы для визуализации тестировали на отсутствие неспецифических реакций. Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Электронномикроскопические исследования

Надпочечники фиксировали в 2,5% (объем/объем) растворе глутарового альдегида в 0,1М какодилатном буфере (pH 7,3) с постфиксацией в 1% (объем/объем) растворе OsO₄ в 0,1М какодилатном буфере (pH 7,3). Дополнительное контрастирование проводили 1% (масса/масса) раствором уранила ацетата. Заливали образцы в смесь эпон 812 и аралдита («Fluka», Германия).

Полутонкие срезы изготавливали с помощью ультратома «PowerTomeX» («RMC Bockeler», США) и после обессмоливания окрашивали азуром II и эозином. После изучения срезов в световом микроскопе изготавливали ультратонкие срезы. Срезы контрастировали раствором 2,5 % (масса/объем) цитрата свинца. Исследование срезов проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии («Libra 120», «Carl Zeiss», Германия). Осуществляли сканирование полученных изображений с помощью цифровой камеры.

На полученных цифровых электроннограммах проводили компьютерную ультраморфометрию. В кортикостероцитах определяли следующие параметры:

1. Диаметр митохондрий, мкм
2. Количество митохондрий в мкм² цитоплазмы
3. Доля митохондрий с отеком матрикса, %
4. Доля площади липидов в цитоплазме, %
5. Диаметр липидных включений, мкм

В адреналоцитах и норадреналоцитах по отдельности определяли:

1. Продольный размер митохондрий, мкм
2. Поперечный размер митохондрий, мкм
3. Количество митохондрий в мкм² цитоплазмы
4. Количество секреторных гранул в мкм² цитоплазмы

Иммуноферментные исследования

Для оценки функциональной активности кортикостероцитов клубочковой и пучковой зон определяли концентрации альдостерона и кортикостерона, в сыворотке крови методом ИФА с помощью наборов («Cusabio», Китай) и («IDS», США), соответственно. Функциональную оценку активности сетчатой зоны проводили с помощью определения в сыворотке крови концентраций эстрадиола и эстрона – конечных продуктов синтеза половых стероидов («DBC», США), с учетом крайне низкой секреции дигидротестостерон сульфата, а также возможного усиления ароматизации надпочечниковых андрогенов. Также для оценки изменения стероидогенеза в сыворотке крови определяли концентрации прогестерона («DBC», США) и 17-оксипрогестерона («Monobind», США).

Секрецию катехоламинов изучали по содержанию с ЭДТА-плазме крови адреналина и норадреналина, определяемых методом ИФА с помощью высокочувствительного набора реактивов “CatCombi” (“IBL International”, Германия) с минимально определяемым содержанием адреналина 0,01 нг/мл и норадреналина 0,02 нг/мл. Функциональную активность хромаффинных клеток оценивали по уровню адреналина в системном кровотоке [236].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США).

Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро-Уилка.

Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением M и стандартной ошибкой среднего значения m .

Сравнение трех независимых групп одного возраста по количественному признаку проводили с помощью параметрического однофакторного анализа вариаций, регрессионного анализа, а двух аналогичных групп разных возрастов

также *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, по качественному признаку – χ^2 .

Для анализа ассоциации количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовали анализ Пирсона, для анализа ассоциации качественных признаков – анализ Спирмена. В связи с возникновением множественных сравнений уровень статистической значимости *p* был принят <0,01.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ И ТОЛЬКО В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

3.1.1. Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы пубертатного возраста

Морфологическая характеристика надпочечников крыс контрольной группы (P42)

У крыс контрольной группы надпочечники представляли собой округлой формы органы, покрытые соединительнотканной капсулой. При исследовании гистологических препаратов экваториальных срезов в надпочечнике четко выделялось корковое и мозговое вещество (рис. 3а). Корковое вещество значительно превалировало над мозговым и составляло в среднем 88% площади среза органа. Капсула органа состояла из соединительнотканых волокон и располагающихся между ними фибробластов, в капсуле встречались кровеносные сосуды и нервные волокна.

В структуре коркового вещества надпочечников хорошо различались три гормонопродуцирующие зоны: клубочковая, пучковая и сетчатая (рис. 3а).

Клубочковая зона располагалась под капсулой в виде непрерывного равномерной толщины слоя. Она занимала менее 10% площади коркового вещества и была представлена кортикостероцитами удлинённой формы с круглыми и овальными ядрами, в центре которых располагалось ядрышко, и просветлённой цитоплазмой. Клетки формировали клубочкообразные структуры, между которыми выявлялись тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани. Про-

светы капилляров были очень малы и, как правило, были заполнены плазмой (рис. 5а).

Между клубочковой и пучковой зоной у крыс контрольной группы выявлялась промежуточная зона, ширина которой значительно варьировала. Площадь, занимаемая промежуточной зоной, составляла менее 2% площади коркового вещества. Промежуточная зона была представлена циркулярно расположенными скоплениями клеток с небольшого размера гиперхромными ядрами овальной формы и резко оксифильной цитоплазмой. Границы между клетками были плохо различимы.

Пучковая зона составляла половину площади коркового вещества надпочечников (рис. 3а). Она была представлена компактно расположенными радиальными тяжами более крупных кортикостероцитов округлой и кубической форм с оксифильной цитоплазмой и округлыми ядрами с центрально расположенным ядрышком. В цитоплазме большинства клеток были видны липидные капли. Между тяжами кортикостероцитов располагались сосуды микроциркуляторного русла с крупными удлинённой формы эндотелиоцитами и хорошо различимым просветом, заполненным плазмой (рис. 6а).

Сетчатая зона коркового вещества была хорошо выражена и составляла в среднем 40% площади коркового вещества (рис. 3а). Она представляла собой анастомозирующую сеть кортикостероцитов, между которыми находились многочисленные капилляры и начальные отделы венул. Клетки наружной части сетчатой зоны имели кубическую форму и округлые ядра. По мере приближения к мозговому веществу размеры клеток становились меньше, клетки приобретали полигональную форму, ядра уменьшались в размерах, становились гиперхромными. Цитоплазма клеток имела ярко выраженные оксифильные свойства, в ней встречались липидные включения (рис. 8а). Просветы сосудов микроциркуляторного русла характеризовались неравномерным кровенаполнением. Большинство из них были свободны, в остальных находилась плазма, реже единичные эритроциты.

Мозговое вещество надпочечников было образовано скоплениями хромаффинных клеток, располагающихся вокруг венозных синусоидов (рис. 9а). Хромаффинные клетки имели круглые и овальные, светлые ядра и цитоплазму с тинкториальными свойствами от слабо до резко базофильных. Скопления хромаффинных клеток были разделены прослойками соединительной ткани, также в мозговом веществе встречались кластеры клеток сетчатой зоны. Венозные синусоиды имели свободный от форменных элементов и плазмы просвет, просветы капилляров были чрезвычайно малы. Также в мозговом веществе встречались нейроны.

Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ Е0-Р42)

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития, надпочечник имел округлую форму, размеры и масса были меньше контрольных значений (рис. 4, табл. 3). Надпочечники были покрыты соединительнотканной капсулой, структура которой соответствовала таковой у крыс контрольной группы. Кортиковое и мозговое вещество были хорошо развиты и имели четкую границу. Площади коркового и мозгового вещества в экваториальных срезах и их соотношение не отличалось от контрольных значений. В корковом веществе выделялись клубочковая, промежуточная, пучковая и сетчатая зоны (рис. 3б).

Вместе с тем в структуре коркового вещества был выявлен ряд изменений. Клубочковая зона была истончена, местами отсутствовала (рис. 5б). Площадь, занимаемая клубочковой зоной, была меньше значений контрольной группы (рис. 4). Кортикостероциты клубочковой зоны имели слабобазофильную и просветленную цитоплазму. Их размеры были статистически значимо меньше значений контрольной группы. Встречались клетки с пикнотически измененными ядрами. Наблюдались изменения в микроциркуляторном русле: сосуды были расширены, часто наблюдались стазы эритроцитов (рис. 5б).

Промежуточная зона составляла около 2% площади коркового вещества, что было больше значений контрольной группы, но ее выраженность была различной. В участках отсутствия клеток клубочковой зоны клетки промежуточной зоны располагались непосредственно под капсулой.

У 40% животных в наружной части пучковой зоны выявлялись различные по размерам участки кровоизлияний и гибели кортикостероцитов. У 60% животных наблюдалось наличие участков в наружной части пучковой зоны не имеющих характерной структуры и представляющих собой скопления клеток без четко выраженной мембраны (рис. 7а), у 40% крыс отмечалось нарушение радиальной ориентации трабекул в пучковой зоне. Часто встречались дистрофически измененные клетки с повышенной оксифилией цитоплазмы и гиперхромными ядрами. Размеры кортикостероцитов пучковой зоны и их ядер были меньше по сравнению с контролем (рис. 4). Сосуды микроциркуляторного русла не были расширены, но у некоторых животных в просветах наблюдался стаз эритроцитов.

Сетчатая зона была менее развита по сравнению с контрольными животными (рис. 4). Площадь сетчатой зоны и количество клеток в мм^2 ее среза были меньше, вследствие чего общее количество клеток сетчатой зоны в экваториальном срезе надпочечника было существенно меньше контрольных значений (рис. 4, табл. 3). Кортикостероциты сетчатой зоны отличались более крупными размерами, в том числе и размерами ядер и более оксифильной цитоплазмой (рис. 4, 8б). Просветы сосудов, как правило, были свободны.

Также были выявлены изменения структуры мозгового вещества. Площадь, занимаемая мозговым веществом, и общая площадь хромаффинных клеток в экваториальных срезах были меньше контрольных значений, но эти различия не достигли статистической значимости (рис. 4). Соединительнотканые перегородки в мозговом веществе были более крупными. Хромаффинные клетки имели меньшие размеры (рис. 4), менее крупные ядра, базофильную цитоплазму. Встречались клетки с пикнозом ядер (рис. 9б). В просветы синусоидов чаще были свободными, реже обнаруживались скопления эритроцитов.

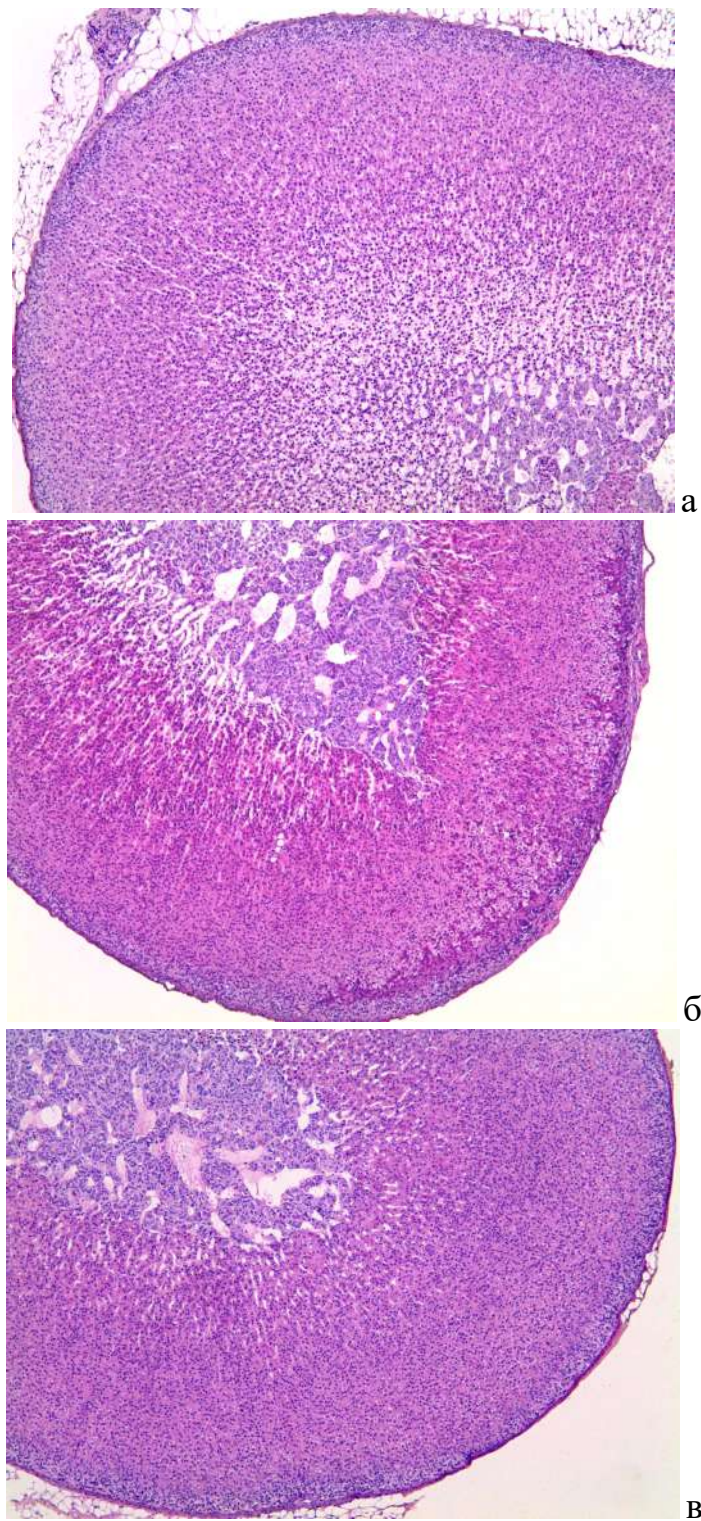


Рис. 3. Строение надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р42 (б) и Р0-Р42 (в). Сетчатая зона в опытных группах менее развита, неравномерность толщины клубочковой зоны и резкая оксифилия клеток пучковой зоны в группе ДДТ Е0-Р42. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 50.

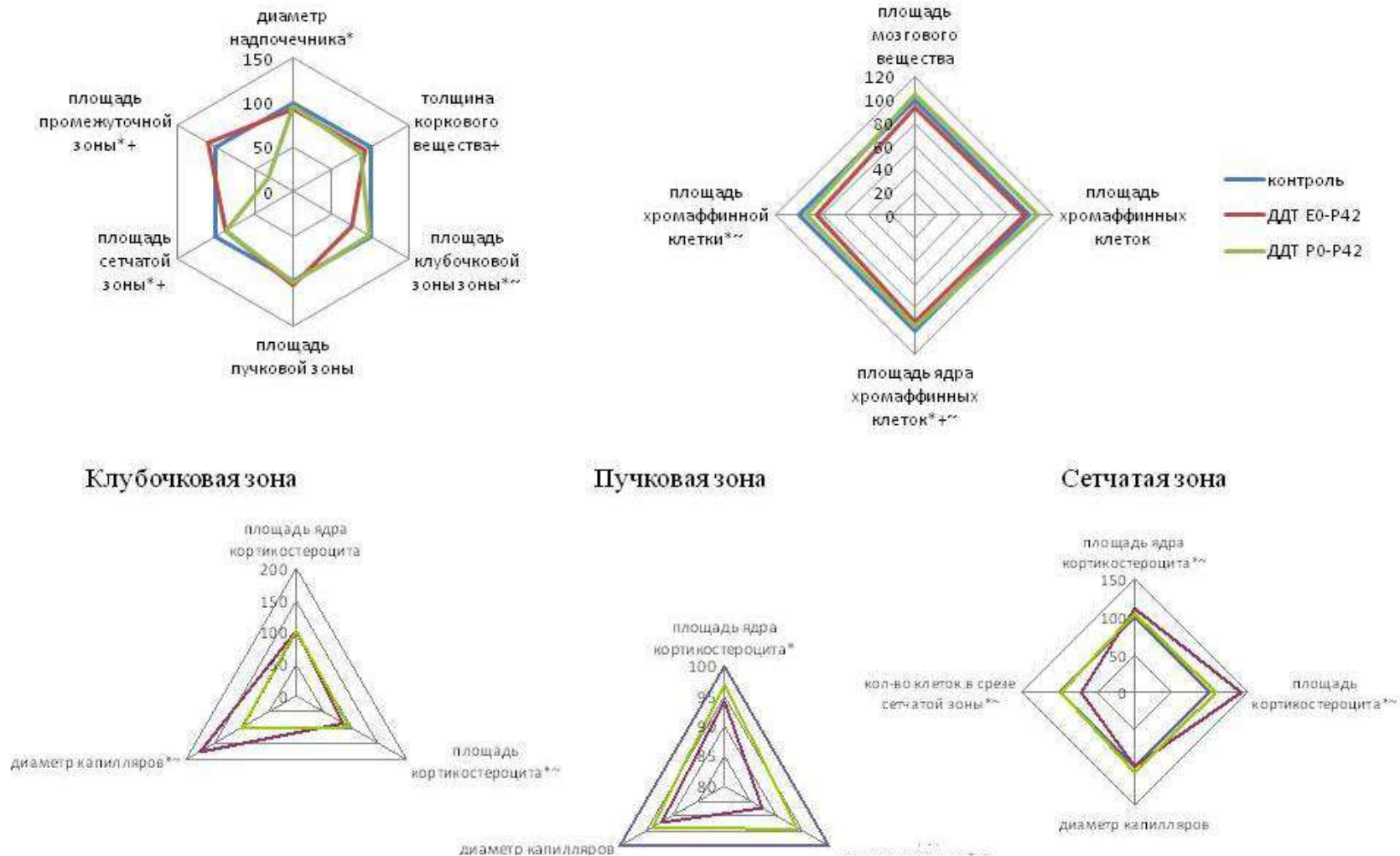


Рис. 4. Морфометрические изменения надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в различные этапы онтогенеза, в пубертатном периоде.

Примечания: * – статистически значимые отличия группы ДДТ E0-P42 от контрольной группы, + – группы ДДТ P0-P42 от контрольной группы, ~ – группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде онтогенеза (ДДТ P0-P42)

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде развития, надпочечник имел округлую форму. Его абсолютная и относительная масса были статистически значимо меньше контрольных значений (табл. 3). Надпочечники были покрыты соединительнотканной капсулой, структура которой не отличалась от таковой у крыс контрольной группы и группы E0-P42. Корковое и мозговое вещество были хорошо развиты и имели четкую границу (рис. 3в). Площадь коркового вещества в экваториальных срезах была наименьшей в исследуемых группах, но соотношение площадей коркового и мозгового веществ не отличалось от контрольного значения (табл. 3). В корковом веществе выделялись клубочковая, промежуточная, пучковая и сетчатая зоны (рис. 3в).

Клубочковая зона располагалась субкапсулярно и характеризовалась большей целостностью. В отличие от группы ДДТ E0-P42 у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде, площадь клубочковой зоны не отличалась от значений контрольной группы (рис. 4). Она была представлена клетками с округлыми крупными ядрами и слабобазофильной и просветленной цитоплазмой, более крупными, чем у крыс группы ДДТ E0-P42 и не отличавшимся по размеру от клеток контрольных животных (рис. 4, 5в). Расширения сосудов микроциркуляторного русла не выявлено. Отмечалось уменьшение площади, занимаемой промежуточной зоной по сравнению с контрольной группой и группой ДДТ E0-P42.

У 12% крыс в пучковой зоне также встречались различные по площади участки кровоизлияний (рис. 7б), гибели клеток и регенерации со скоплениями клеток, не имеющих еще характерного для пучковой зоны строения. Площадь пучковой зоны не отличалась от значений контрольной группы (рис. 3). Она была представлена радиально расположенными тяжами кортикостероцитов меньшего, чем в контрольной группе, но большего размера,

чем в группе ДДТ Е0-Р42. Размер ядер не был уменьшен (рис. 4). Цитоплазма клеток была умеренно оксифильной, липидные капли встречались реже (рис. 6в). Изменения клеток пучковой зоны в виде уменьшения их размера, повышения оксифилии цитоплазмы и гиперхромазии ядер встречались у 25% крыс. У 12% крыс на границе сетчатой зоны и мозгового вещества также встречались участки кровоизлияний. При этом в пучковой зоне расширения капилляров и стаза форменных элементов не наблюдалось.

В сетчатой зоне также выявлены морфологические изменения. Площадь сетчатой зоны в экваториальных срезах надпочечников была статистически значимо меньше значений контрольной группы и соответствовала значениям группы ДДТ Е0-Р42 (рис. 4). Однако в этой группе структура сетчатой зоны характеризовалась большей плотностью клеток, вследствие чего общее количество кортикостероцитов в срезе сетчатого вещества было на треть больше, чем в группе ДДТ Е0-Р42 и не отличалось от значений контрольной группы (рис. 4, табл. 3). Кортикостероциты сетчатой зоны отличались разноразмерностью. Их средние размеры и размеры их ядер были меньше, чем в группе ДДТ Е0-Р42 и не отличались от контрольных значений (рис. 4). Клетки с выраженной оксифилией цитоплазмы встречались реже, чем в группе ДДТ Е0-Р42. Просветы сосудов, как правило, были свободны.

Мозговое вещество в надпочечниках крыс группы ДДТ Р0-Р42 было хорошо выражено. Площадь, занимаемая мозговым веществом в экваториальных срезах, а также площадь, занимаемая хромаффинными клетками в мозговом веществе, была наибольшей в сравниваемых группах, но эти различия не достигли статистической значимости (рис. 4, табл. 3). Как и в предыдущих группах хромаффинные клетки составляли три четверти площади мозгового вещества. Их тяжи разделялись соединительнотканными перегородками. Сосудистое русло было хорошо развито, просветы синусоидов были заполнены плазмой и были свободны от форменных элементов. Размеры хромаффинных клеток и их ядер были больше, чем в группе ДДТ Е0-Р42, но меньше, чем в контрольной группе (рис. 4). Большая часть клеток характери-

зовалась умеренной базофилией цитоплазмы. Клетки с пикнозом и гиперхромазией ядер встречались у 25% крыс (рис. 9в). Как и в предыдущих группах в мозговом веществе обнаруживались кластеры кортикостероцитов сетчатой зоны. В единичных случаях в мозговом веществе обнаруживались клетки, по структуре аналогичные клеткам пучковой зоны.

Заключение. У крыс, подвергавшихся воздействию в пре- и постнатальном периодах онтогенеза, к пубертатному периоду надпочечник не достиг размеров контрольных животных, но имел сформированное корковое и мозговое вещество, соотношение которых соответствовало контрольным значениям. Меньший диаметр надпочечника был связан с уменьшением размеров коркового вещества, а именно его сетчатой и клубочковой зон. Стазы эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла в клубочковой зоне и кровоизлияния между клубочковой и пучковой зонами приводили к нарушению трофики и гибели клеток в этих зонах. Также наблюдались участки регенерации пучковой зоны с формирующейся гистоархитектоникой. Клетки сетчатой зоны и их ядра, напротив, были увеличены в размерах. Промежуточная зона в корковом веществе стала более выраженной. Наблюдалась тенденция к уменьшению площади мозгового вещества. Хромаффинные клетки и их ядра имели меньший по сравнению с контрольными животными размер, встречались гибнущие клетки.

В группе, подвергавшейся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде, наблюдались аналогичное уменьшение размера надпочечника и толщины коркового вещества, но оно происходило за счет более выраженного уменьшения сетчатой, нежели клубочковой зоны. Значительно уменьшилась промежуточная зона. Нарушения микроциркуляции и кровоизлияния в корковом веществе, а, следовательно, и дистрофические и репаративные изменения были выражены в меньшей степени. Сетчатая зона отличалась большим количеством кортикостероцитов, но значительно меньшего размера. Цитоморфология хромаффинных клеток соответствовала предыдущей опытной группе.

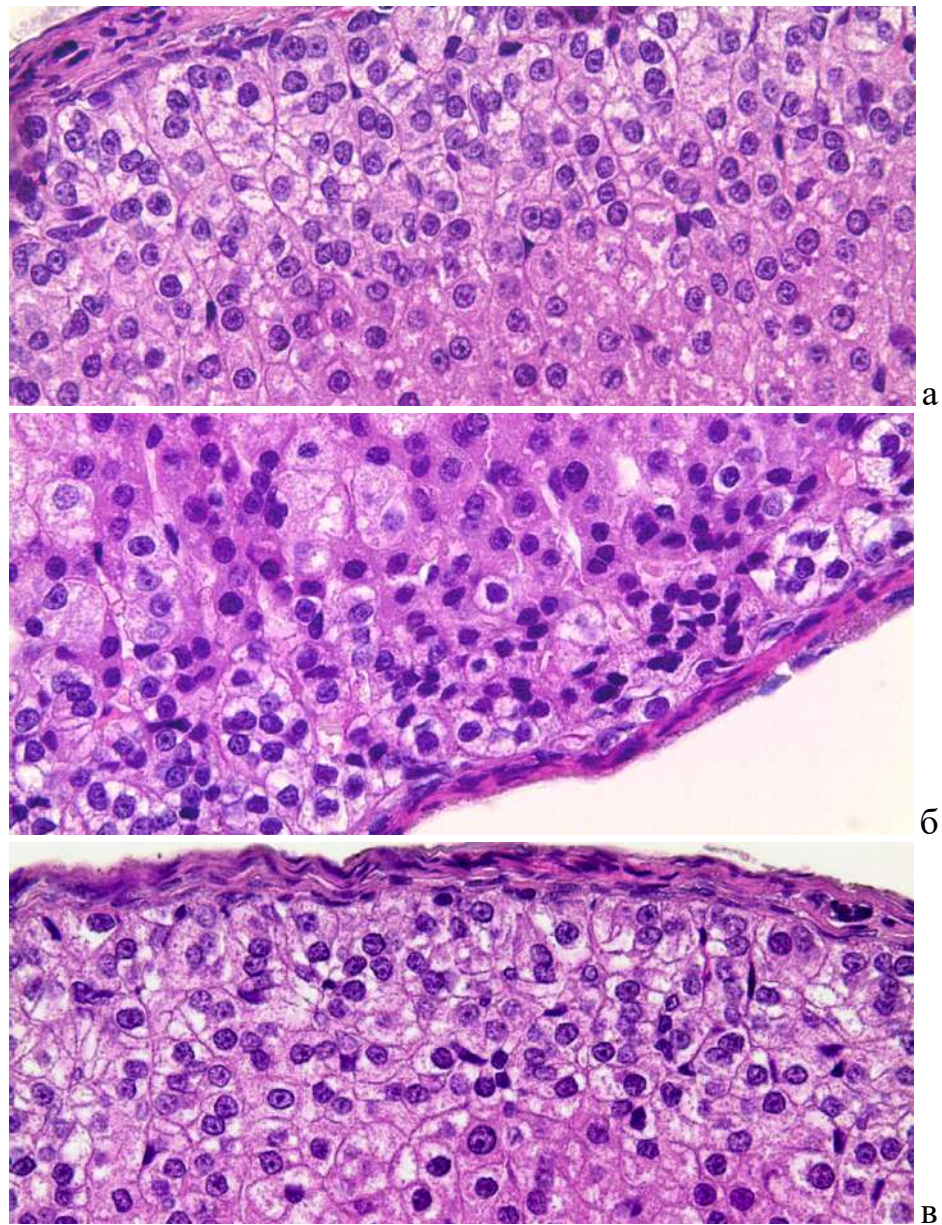


Рис. 5. Строение клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р42 (б) и Р0-Р42 (в).

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 клубочковая зона истончена, многие клетки дистрофически изменены, сосуды микроциркуляторного русла расширены, просветы обтурированы эритроцитами. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 клетки имеют просветленную цитоплазму.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

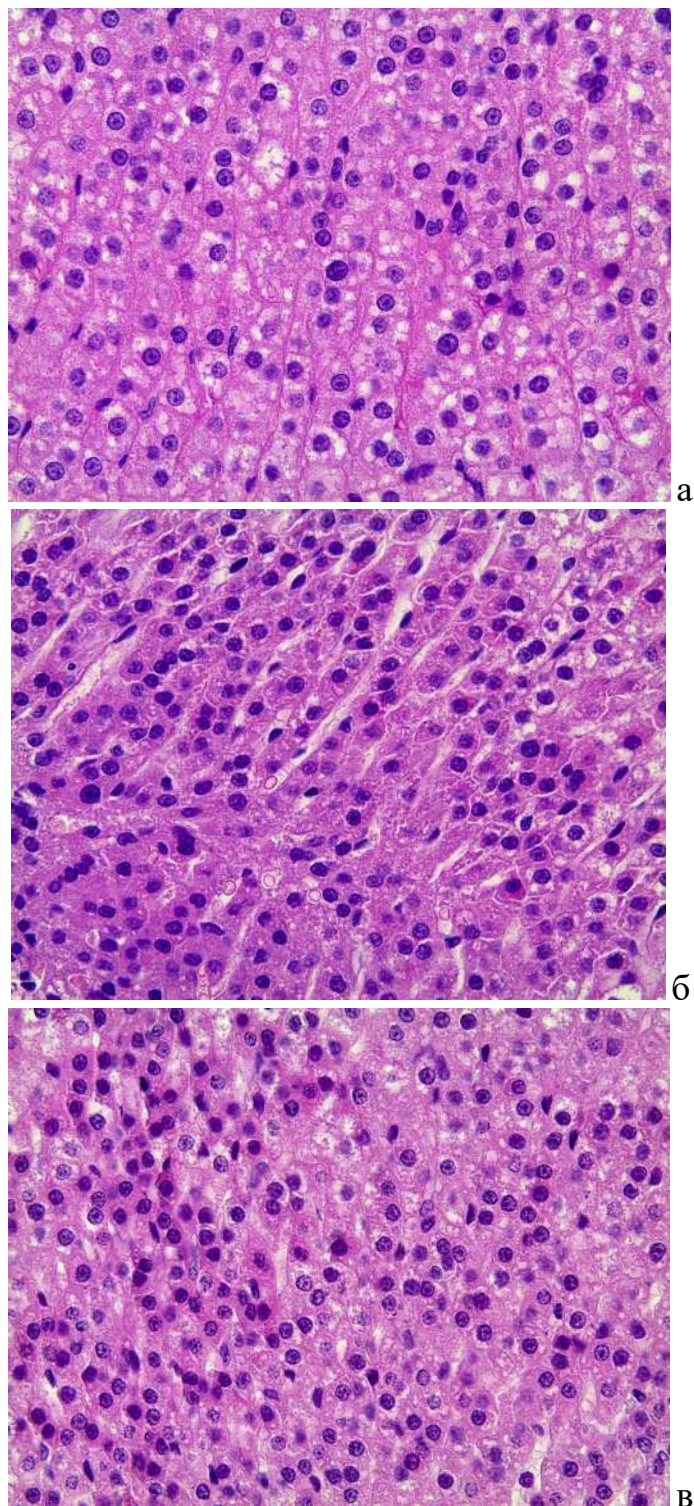


Рис. 6. Строение пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р42 (б) и Р0-Р42 (в).

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 отмечаются изменения размеров и цитологических свойств клеток пучковой зоны, расширение капилляров, просветы капилляров заполнены эритроцитами. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 клетки имеют меньшие размеры, встречаются клетки с повышенной оксифилией цитоплазмы и гиперхромными ядрами.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

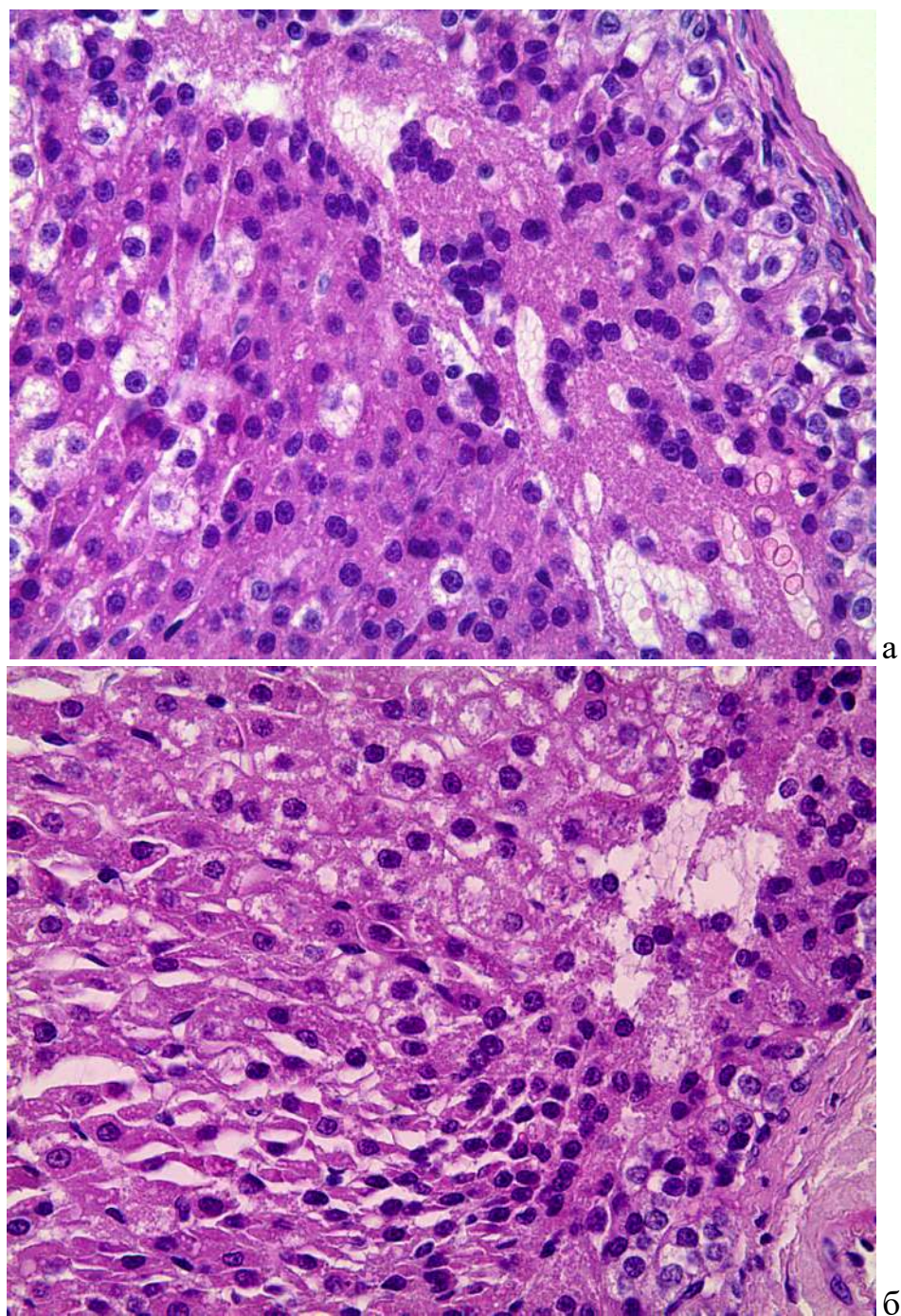


Рис. 7. Изменения в пучковой зоне коркового вещества надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития, подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды E0-P42 (а) и P0-P42 (б).

У крыс групп ДДТ E0-P42 и ДДТ P0-P42 в верхних слоях пучковой зоны расширение сосудов микроциркуляторного русла, стаз эритроцитов, кровоизлияния, участки гибели клеток, дистрофические изменения кортикостероцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

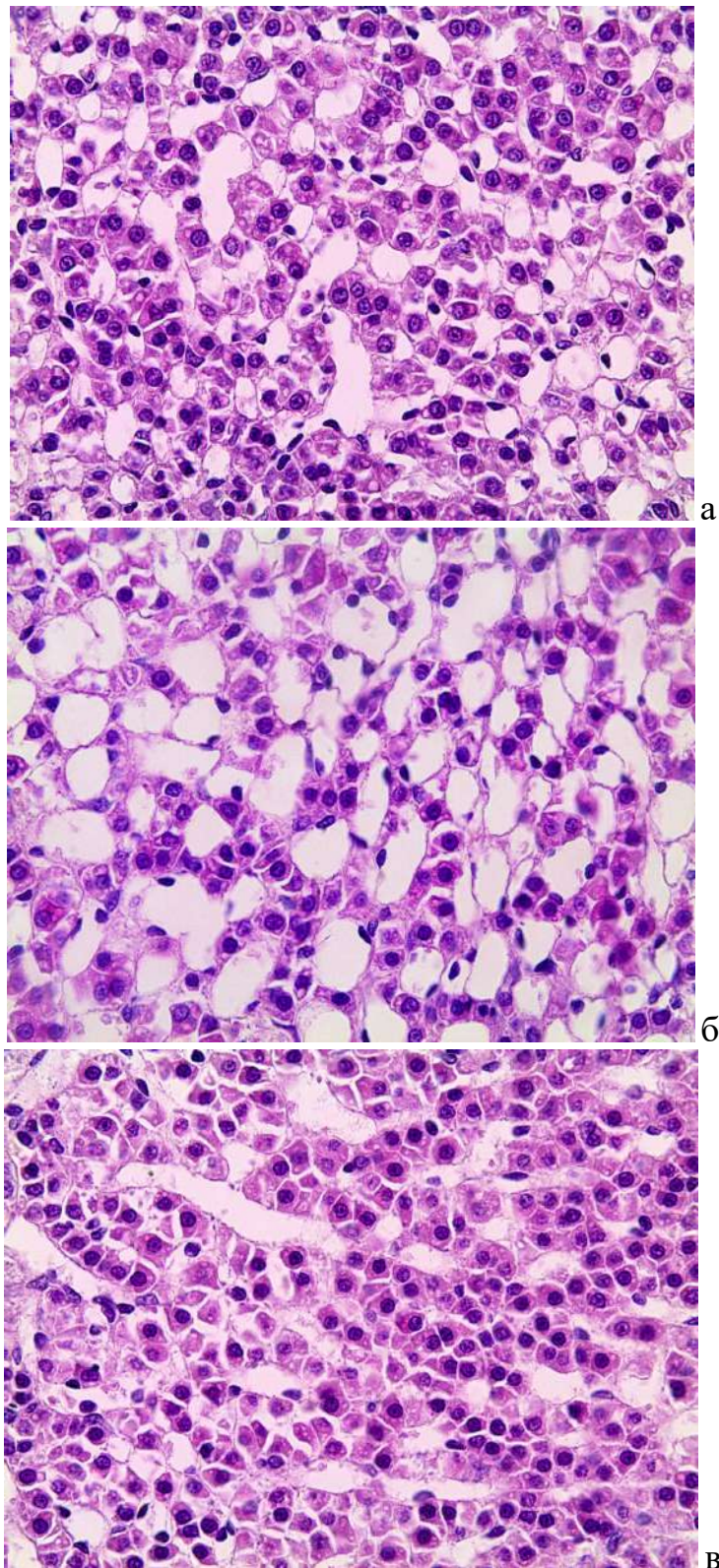


Рис. 8. Изменения структуры сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды E0-P42 (б) и P0-P42 (в). У крыс групп ДДТ E0-P42 сетчатая зона имеет более рыхлое строение. У крыс группы ДДТ P0-P42 клетки в сетчатой зоне расположены очень компактно. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

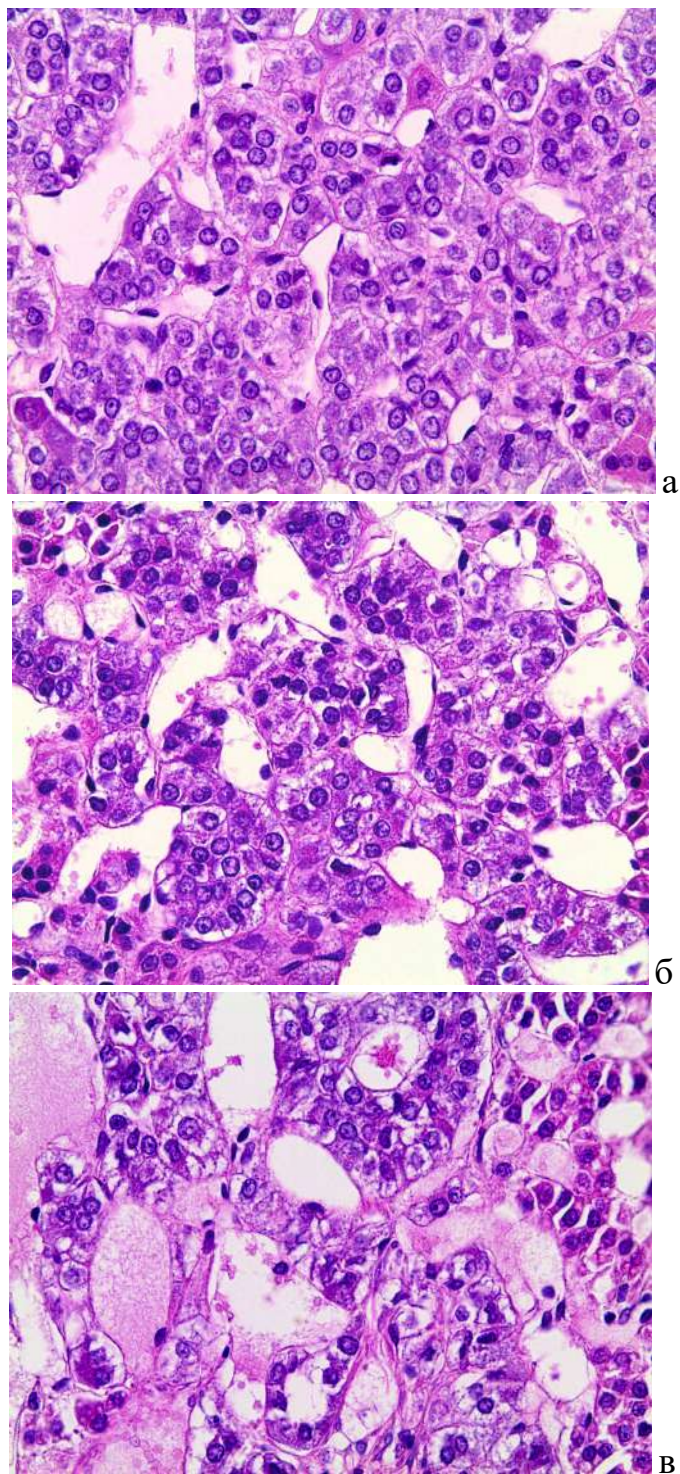


Рис. 9. Структура мозгового вещества надпочечника крыс на 42-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р42 (б) и Р0-Р42 (в).

У крыс групп ДДТ Е0-Р42 хромафинные клетки меньших размеров, цитоплазма более базофильна, встречаются клетки с пикнотизированными ядрами. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 клетки хромафинные клетки также имеют меньшие размеры, у многих клеток ядра пикнотизированы, цитоплазма просветлена, венозные синусоиды заполнены плазмой и эритроцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Морфологические характеристики надпочечников крыс контрольной группы (P42) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в пубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P42	E0-P42	P0-P42
Относительная масса надпочечника, %	0,008 $\pm$ 0,0002	0,007 $\pm$ 0,002*	0,007 $\pm$ 0,0002*
Диаметр надпочечника, мкм	2670,30 $\pm$ 67,81	2479,0 $\pm$ 62,46*	2571,50 $\pm$ 64,59
Толщина коркового вещества, мкм	897,75 $\pm$ 23,31	840,27 $\pm$ 30,25	797,38 $\pm$ 19,91*
Площадь коркового вещества, мкм ²	4862960,0 $\pm$ 135569,16	4592075,0 $\pm$ 87674,04*	4566800,0 $\pm$ 152972,2
Доля площади коркового вещества, %	87,87 $\pm$ 0,91	87,70 $\pm$ 0,96	86,66 $\pm$ 0,97
Площадь мозгового вещества, мкм ²	666800,00 $\pm$ 41557,37	623750,0 $\pm$ 42364,37	702400,00 $\pm$ 42471,60
Площадь клубочковой зоны, мкм ²	440006,00 $\pm$ 25514,7	335587,50 $\pm$ 26027,40*	432200,00 $\pm$ 24282,00♦
Площадь пучковой зоны, мкм ²	2318394,00 $\pm$ 154751,10	2421087,50 $\pm$ 89626,70	2346720,00 $\pm$ 164446,60
Площадь сетчатой зоны, мкм ²	2016960,00 $\pm$ 98409,90	1750225,00 $\pm$ 68586,70*	1757600,00 $\pm$ 70216,50*
Площадь промежуточной зоны, мкм ²	87614,00 $\pm$ 2062,9	96100,00 $\pm$ 3738,30*	31200,00 $\pm$ 2020,00*
Доля площади клубочковой зоны в корковом веществе, %	9,09 $\pm$ 0,47	7,54 $\pm$ 0,66*	9,54 $\pm$ 0,58♦
Доля площади пучковой зоны в корковом веществе, %	47,77 $\pm$ 2,87	53,36 $\pm$ 1,97	49,91 $\pm$ 0,42
Доля площади сетчатой зоны в	41,36 $\pm$ 2,36	37,16 $\pm$ 1,32*	39,66 $\pm$ 2,18

корковом веществе, %			
Доля площади промежуточной зоны в корковом веществе, %	1,84±0,05	1,96±0,04*	0,90±0,04*♦
Количество кортикостероцитов в 1мм ² сетчатой зоны	6983,75±197,15	5653,00±192,85*	7650,00±115,85*♦
Общее количество кортикостероцитов в срезе сетчатой зоны	14085,94±704,30	9894,02±335,40*	13678,20±410,34♦
Диаметр капилляров клубочковой зоны, мкм	2,28±0,14	3,95±0,21*	2,29±0,07♦
Диаметр капилляров пучковой зоны, мкм	3,43±0,14	3,17±0,11	3,25±0,12
Диаметр капилляров сетчатой зоны, мкм	9,24±0,42	9,01±0,58	9,88±0,36
Общая площадь хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества, мкм ²	501060,00±26642,15	476925,0±44580,04	536020,0±44879,5
Доля хромаффинных клеток в площади мозгового вещества, %	74,50±1,83	76,46±1,67	76,17±1,98

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы, ♦ – группы P0-P42 от группы E0-P42.

3.1.2. Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы после наступления половой зрелости

Морфологическая характеристика надпочечников крыс контрольной группы (P70)

К 70-му дню постнатального онтогенеза масса и размеры надпочечника крыс статистически значимо увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 10, табл. 4). Надпочечник имел округлую форму и был покрыт соединительнотканной капсулой, в структуре которой отчетливо выделялись два слоя: наружный, состоящий из волокон, и внутренний, в котором находились фиброциты.

Корковое и мозговое вещество были хорошо выражены (рис. 27а). Их соотношение не изменилось.

В корковом веществе были хорошо различимы клубочковая, пучковая и сетчатая зоны, но площади, занимаемыми этими зонами в экваториальных срезах органа, и соответственно, их соотношение в корковом веществе изменились по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 10, 27а, табл. 4).

Клубочковая зона имела равномерную толщину. Ее площадь уменьшилась в среднем на четверть по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 10). Кортикостероциты клубочковой зоны формировали типичные структуры (рис. 28а). Капиллярная сеть была хорошо выражена, но диаметр капилляров стал меньше (рис. 11). Просветы капилляров, как правило, были заполнены плазмой. Кортикостероциты уменьшились в размерах (рис. 11) и имели в основном просветленную цитоплазму. Ядра на срезе имели округлую, реже овальную форму, в них хорошо визуализировалось ядрышко. Размеры ядер кортикостероцитов клубочковой зоны не претерпели существенных изменений (рис. 11). Между клубочковой и пучковой зонами встреча-

лись фрагментарно расположенные участки промежуточной зоны, как и в предыдущем сроке исследования.

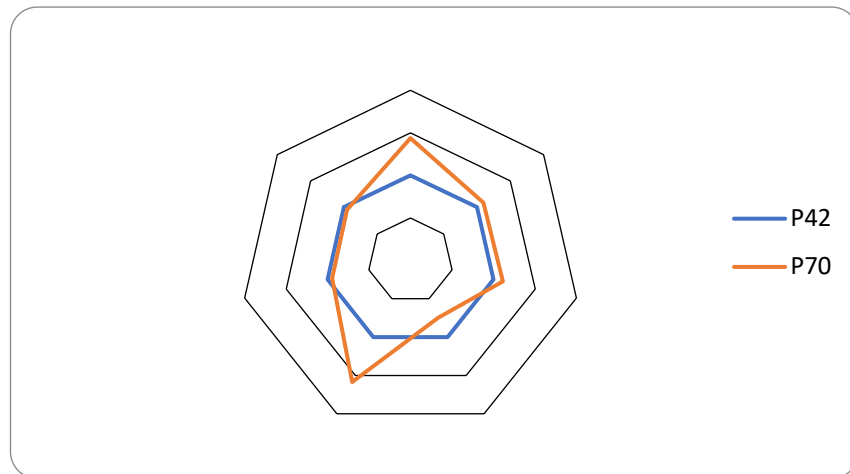


Рис. 10. Возрастная основных параметров строения надпочечника и коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

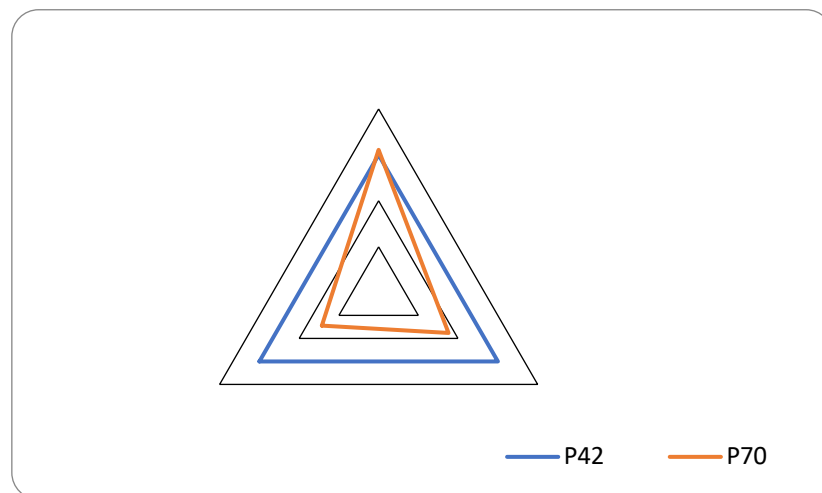


Рис. 11. Возрастные изменения структуры клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Пучковая зона была представлена тяжами крупных клеток со слабо-оксифильной и просветленной цитоплазмой. Размер кортикостероцитов уве-

личился по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 12). Ядра располагались в клетках центрально, в них хорошо визуализировалось одно, реже два, ядрышка. Тяжи кортикостероцитов более плотно прилегали друг к другу из-за сужения разделявших их капилляров (рис.12). Просветы капилляров, как правило, были заполнены плазмой. Площадь, занимаемая в корковом веществе пучковой зоной, увеличилась в полтора раза по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 10).

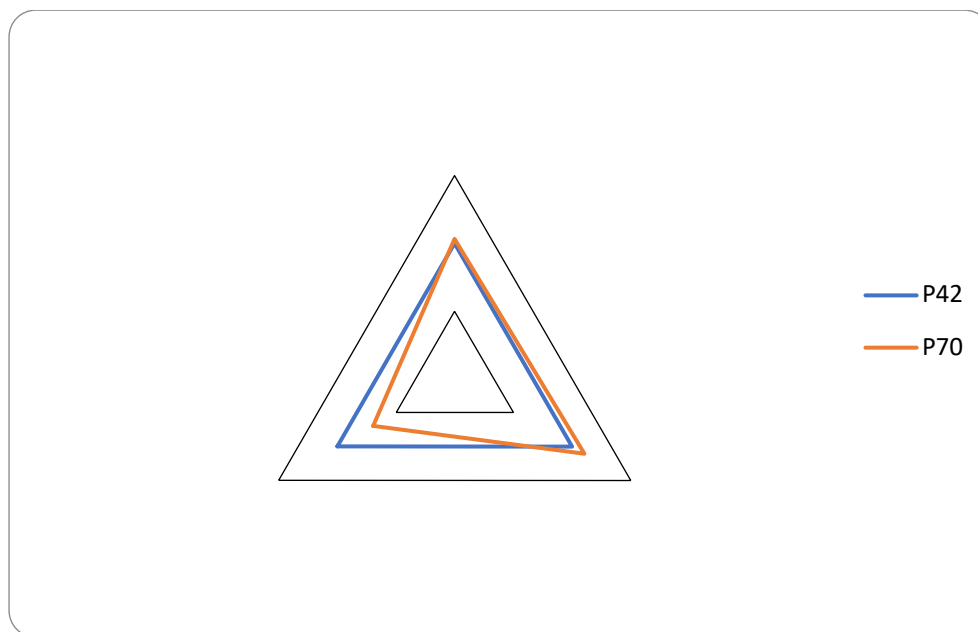


Рис. 12. Возрастные изменения структуры пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Сетчатая зона была менее выражена. Площадь, занимаемая в корковом веществе, незначительно уменьшилась, а количество кортикостероцитов в мм² среза и в срезе всей сетчатой зоны не изменилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 10, табл. 4). Кортикостероциты уменьшились в размерах (рис. 13). Их ядра имели небольшой размер и округлую форму с центрально расположенным ядрышком. Встречались клетки с пикнотизированными ядрами. Цитоплазма имела умеренно и слабо оксифильные

тинкториальные свойства (рис. 30а). Диаметр капилляров увеличился на треть по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 13). Просветы капилляров были свободны.

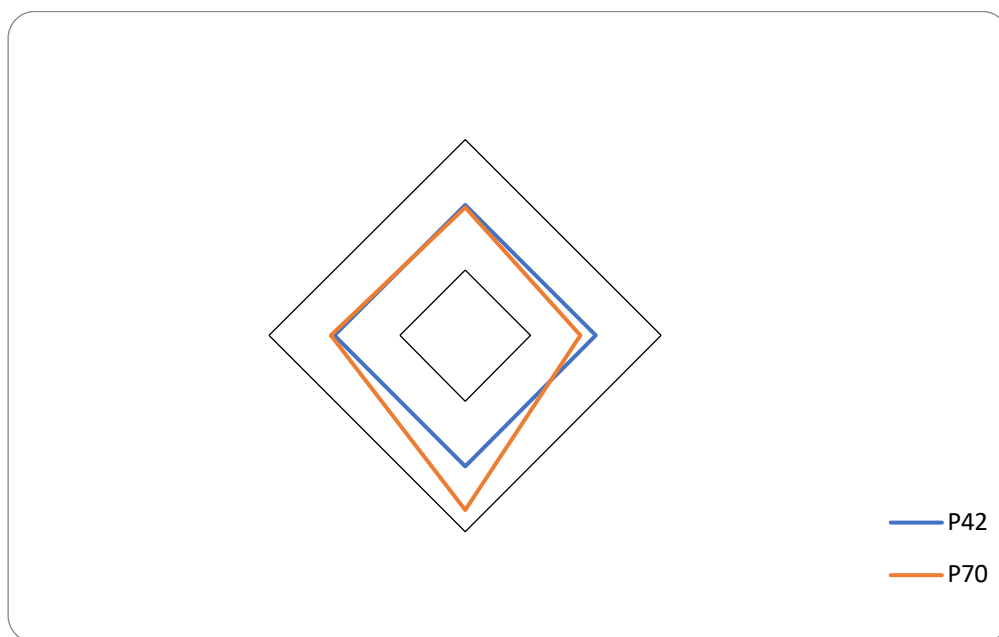


Рис. 13. Возрастные изменения структуры сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Мозговое вещество представляло собой крупные скопления хромаффинных клеток, разделенные тонкими соединительнотканными перегородками (рис. 31а). Поверхности клеток контактировали с капиллярами, просвет которых был очень мал, и с венозными синусоидами, просвет которых в основном был свободным. Площадь мозгового вещества и хромаффинных клеток в нем увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования, соответственно, паренхиматозно-стромальное соотношение в мозговом веществе не изменилось (рис. 14). Размеры хромаффинных клеток стали меньше, но размер ядер не изменился (рис. 14). Хромаффинные клетки имели слабобазофильную цитоплазму. В мозговом веществе встречались клетки сетчатой зоны коркового вещества.

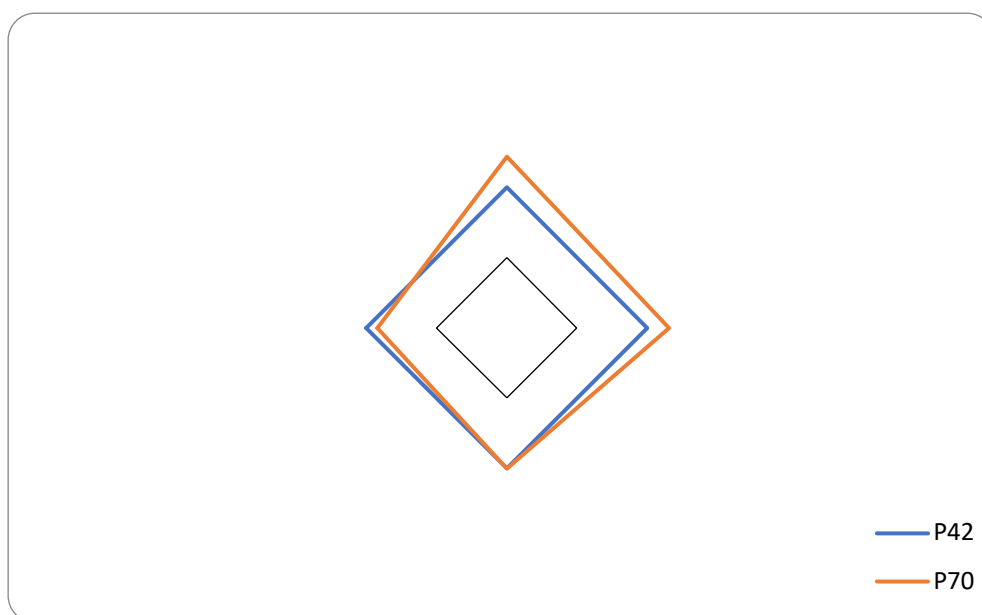


Рис. 14. Возрастная динамика основных параметров строения мозгового вещества надпочечника крыс контрольной группы.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ E0-P70)

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития, масса и размеры надпочечников увеличились по сравнению с 42-ыми сутками постнатального развития, как и в контрольной группе, но масса органа не достигла контрольных значений (рис. 15, табл. 4). Надпочечник представлял собой округлое образование и был покрыт соединительнотканной капсулой. Как и у контрольных животных, в капсуле наблюдалось формирование внутреннего слоя, содержащего фиброциты, и наружного, состоящего из компактно лежащих волокон.

На срезе корковое и мозговое вещество имели четкую границу (рис. 276) . По сравнению с предыдущим сроком исследования выявлено увеличение площади коркового вещества и незначительное уменьшение площади

мозгового, что привело к статистически значимому изменению соотношения коркового и мозгового вещества по сравнению с контрольными значениями (табл. 4).

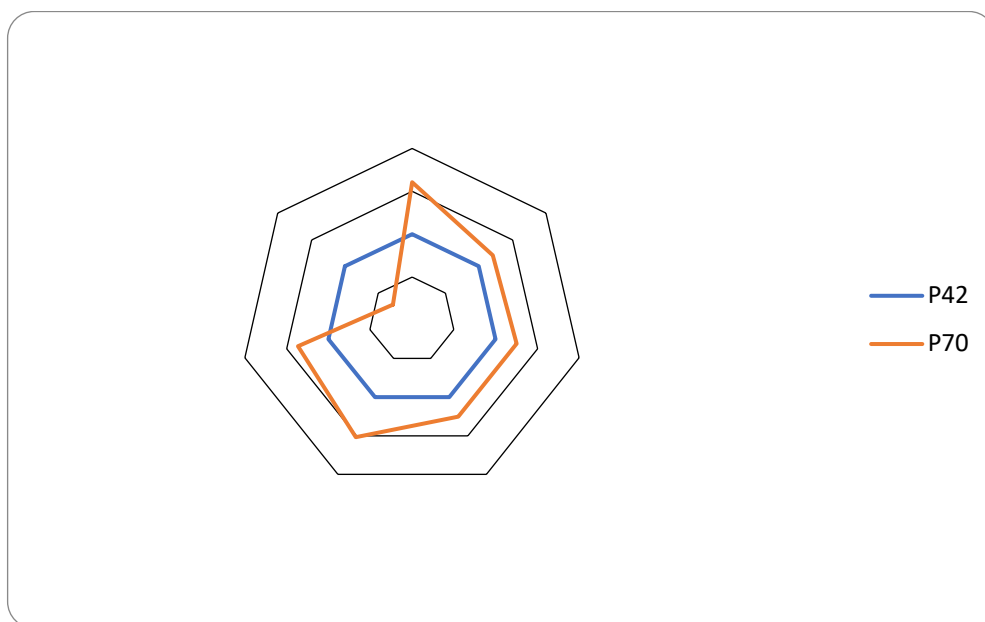


Рис. 15. Возрастная морфодинамика основных параметров строения надпочечника и коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ Е0-Р70. Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

В корковом веществе существенных изменений соотношения площадей, занимаемых клубочковой, пучковой и сетчатыми зонами, не произошло в отличие от контрольной группы (табл. 4).

Клубочковая зона немного увеличилась в размерах, которые превысили контрольные значения, но в основном за счет восстановления ее целостности, а не ее расширения (рис. 15, 20). По сравнению с предыдущим сроком размеры кортикостероцитов и их ядер не изменялись (рис. 16). Клетки имели просветленную, а также слабооксифильную цитоплазму и округлое ядро с центрально расположенным ядрышком. В клубочковой зоне хорошо визуализировались капилляры. Их диаметр значительно уменьшился по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 16). Просветы капилляров были за-

полнены плазмой. Под клубочковой зоной располагались фрагменты промежуточной зоны. Ее площадь уменьшилась и была в три раза меньше, чем в контрольной группе (рис. 15, 20).

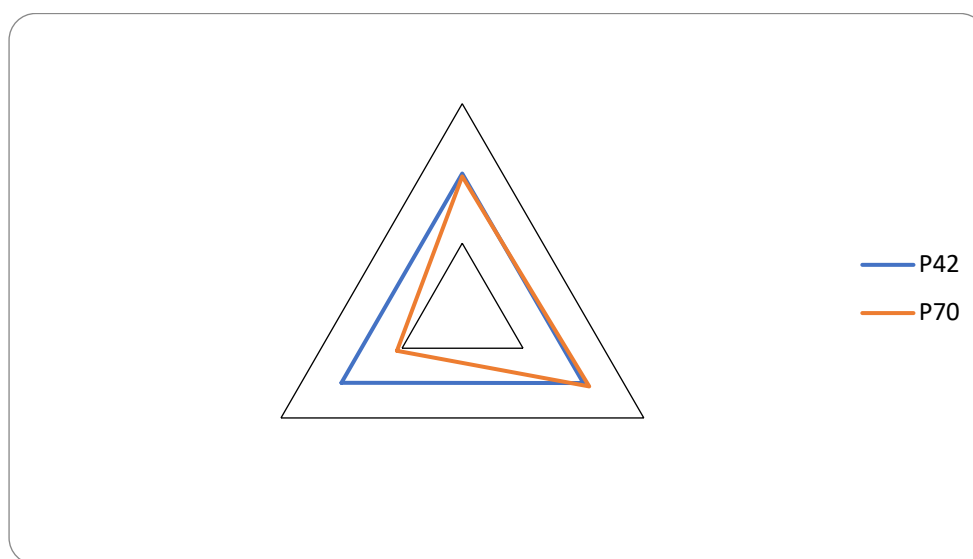


Рис. 16. Возрастные изменения структуры клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ Е0-Р70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Площадь, занимаемая в экваториальном срезе надпочечника пучковой зоной, увеличилась в полтора раза по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовала значениям контрольной группы (рис. 15, 20, табл. 4). Пучковая зона состояла из тяжей кортикостероцитов, имеющих более крупные размеры, чем у животных контрольной группы (рис. 20). Между тяжами клеток находились капилляры, заполненные плазмой, встречался стаз эритроцитов. Диаметр капилляров не уменьшался по сравнению с предыдущим сроком исследования в отличие от крыс контрольной группы (рис. 17). У 50% животных в пучковой зоне выявлялись дистрофические изменения и гибель кортикостероцитов, в сочетании со стазом эритроцитов в капиллярах и образование участков, представляющих собой скопления клеток без четко выраженной цитоархитектоники, клеточного детрита в наружной части пуч-

ковой зоны без лейкоцитарной инфильтрации, в то время как в других участках пучковой зоны обнаруживались скопления лейкоцитов как в капиллярах, так и вокруг кортикостероцитов, увеличенных в размерах с просветленной цитоплазмой (рис. 29).

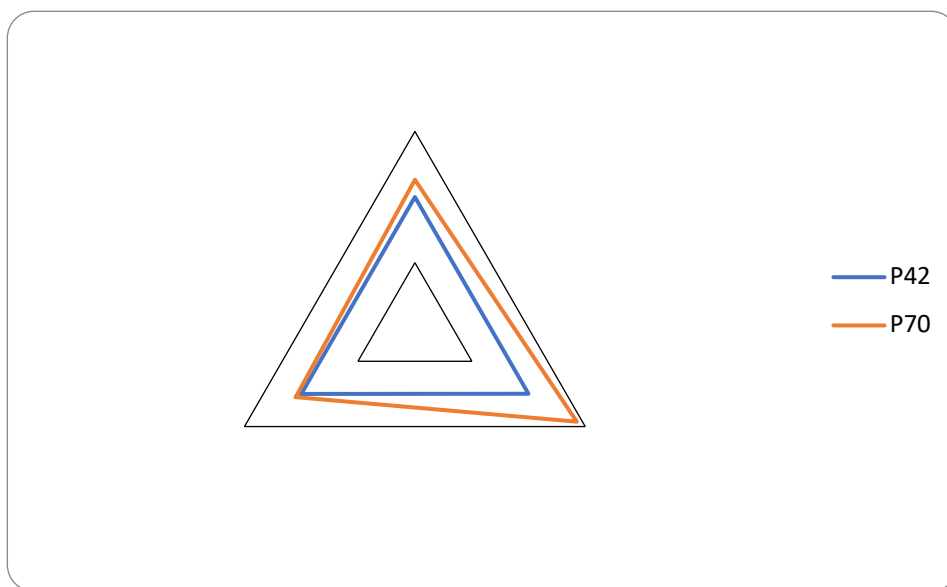


Рис. 17. Возрастные изменения структуры пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ Е0-Р70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Площадь, занимаемая в срезах надпочечников сетчатой зоной, увеличилась более, чем на треть по сравнению с предыдущим сроком и превысила значения контрольной группы (рис. 15, 20). Кортикостероциты сетчатой зоны и их ядра уменьшились в размерах, но были более крупными, чем у крыс контрольной группы (рис. 18, 20). Они имели округлое ядро, в котором располагалось одно, реже два ядрышка. Оксифилия цитоплазмы была более выражена, чем у крыс контрольной группы (рис. 30б). Количество кортикостероцитов в мм^2 среза сетчатой зоны не изменялось и было меньше, чем в контрольной группе, но за счет увеличения площади сетчатой зоны их общее количество достигло контрольных значений (рис. 20, табл. 4). Диаметр капил-

ляров увеличился и не имел отличий от значений контрольной группы (рис. 18, 20). У некоторых крыс в сетчатой зоне встречались кластеры клеток пучковой зоны с типичным трабекулярным строением, а клетки сетчатой зоны обнаруживались в срезах мозгового вещества.

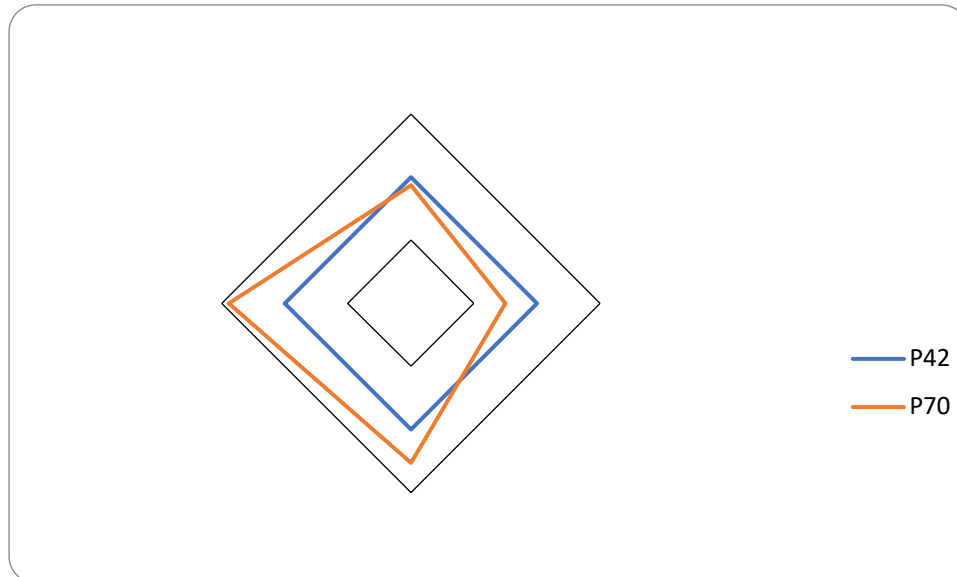


Рис. 18. Возрастные изменения структуры сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ E0-P70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Мозговое вещество надпочечника было развито в значительно меньшей степени, чем у крыс контрольной группы (рис. 20). Площадь, занимаемая хромаффинными клетками в мозговом веществе, уменьшилась (рис. 19, табл. 4). Но размеры хромаффинных клеток и их ядер увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования и сравнялись с контрольными значениями (рис. 19, 20). Цитоплазма хромаффинных клеток была просветлена или имела слабобазофильные тинкториальные свойства. Встречались клетки с резко базофильной цитоплазмой и пикнотически измененными ядрами (рис. 31б). Венозные синусоиды, как правило, имели свободный просвет.

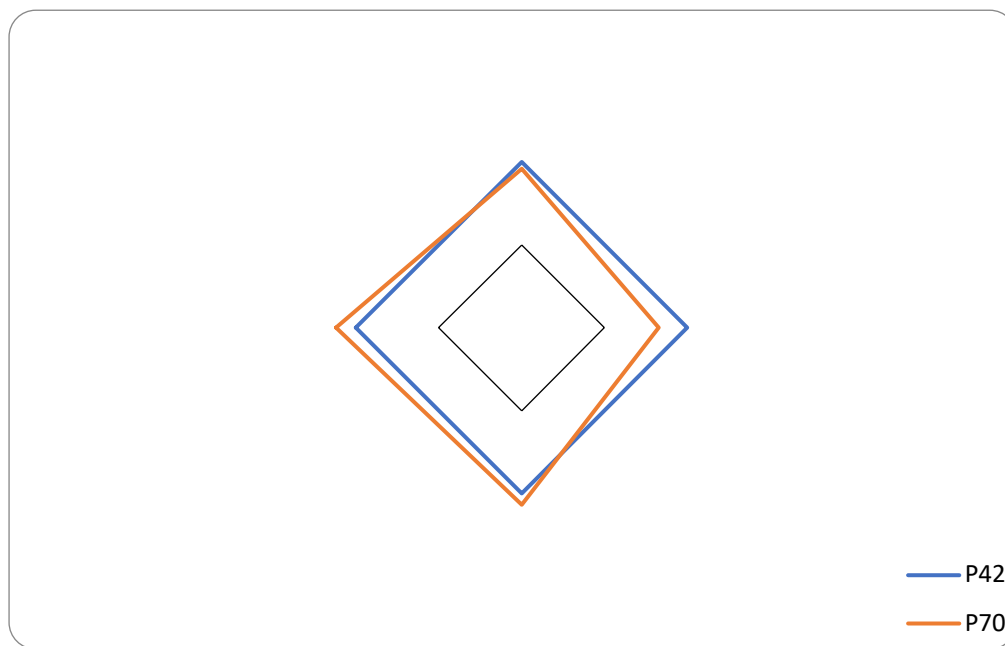


Рис. 19. Возрастная динамика основных параметров строения мозгового вещества надпочечника крыс группы E0-P70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

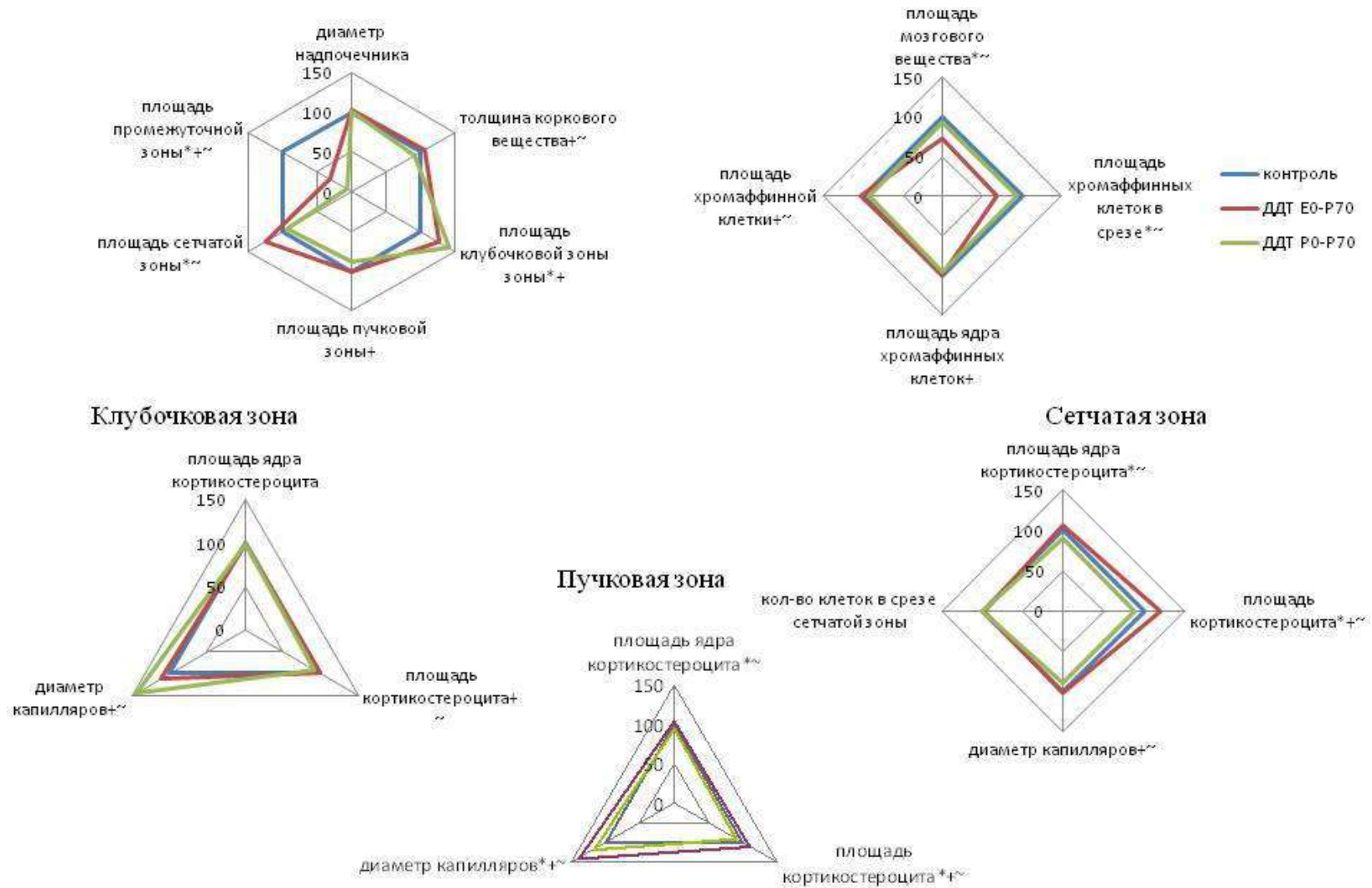


Рис. 20. Морфологические изменения надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в различные этапы онтогенеза, в постпубертатном периоде (70-ые сутки).

Примечания: * – статистически значимые отличия группы ДДТ Е0-Р70 от контрольной группы, + – группы ДДТ Р0-Р70 от контрольной группы, ~ – группы ДДТ Р0-Р70 от группы ДДТ Е0-Р70.

Морфологическая характеристика надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде онтогенеза (ДДТ P0-P70)

К 70-м суткам постнатального развития у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде онтогенеза, размеры надпочечника увеличились аналогично контрольным значениям (рис. 21, табл. 4). Надпочечник был покрыт соединительнотканной капсулой, отличающейся отсутствием двухслойной структуры, характерной для крыс контрольной группы аналогичного возраста.

На срезе корковое и мозговое вещество имели четкую границу (рис. 27в). Площадь коркового вещества увеличилась по сравнению с прошлым сроком исследования в значительно меньшей степени и была статистически значимо меньшей как по сравнению с контрольными значениями, так и значениями группы ДДТ E0-P70 (рис. 20, табл. 4). Площадь мозгового вещества не изменялась и соответствовала значениям крыс контрольной группы, но была статистически значимо больше, чем у группы ДДТ E0-P70 (рис. 20, табл. 4). Таким образом, соотношение в надпочечнике коркового и мозгового вещества было аналогичным контрольному, но отличалось от группы ДДТ E0-P70 меньшей долей коркового вещества (табл. 4).

Клубочковая зона была хорошо выражена. Ее площадь не изменялась по сравнению с предыдущим сроком и превысила значения, как контрольной группы, так и группы ДДТ E0-P70 (рис. 20, 21, рис. 28в). Но у большинства крыс отмечалась неравномерность ее толщины и даже очаговое отсутствие под капсулой. Кортикостероциты клубочковой зоны уменьшились в размерах, размеры их ядер не изменялись (рис. 22). Цитоплазма кортикостероцитов была просветлена. Капилляры имели больший просвет, нежели на 42-ые сутки постнатального развития, были заполнены плазмой (рис. 22). Диаметр капилляров был значительно больше, чем у крыс контрольной группы и группы ДДТ E0-P70 (рис. 20). Промежуточная зона стала менее выраженной как по сравнению

с предыдущим сроком исследования, так и с контрольной группой и группой ДДТ E0-P70 (рис. 20, 21).

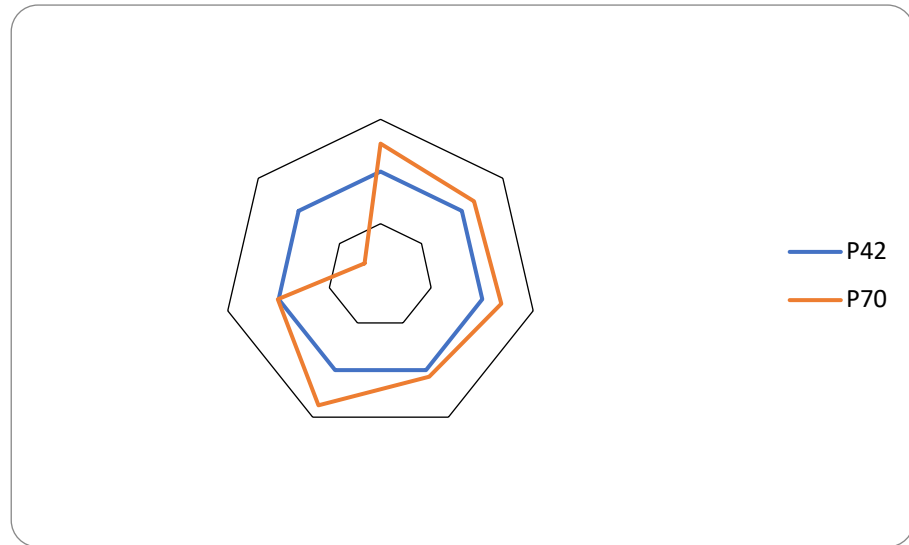


Рис. 21. Возрастная динамика основных параметров строения надпочечника и коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ P0-P70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

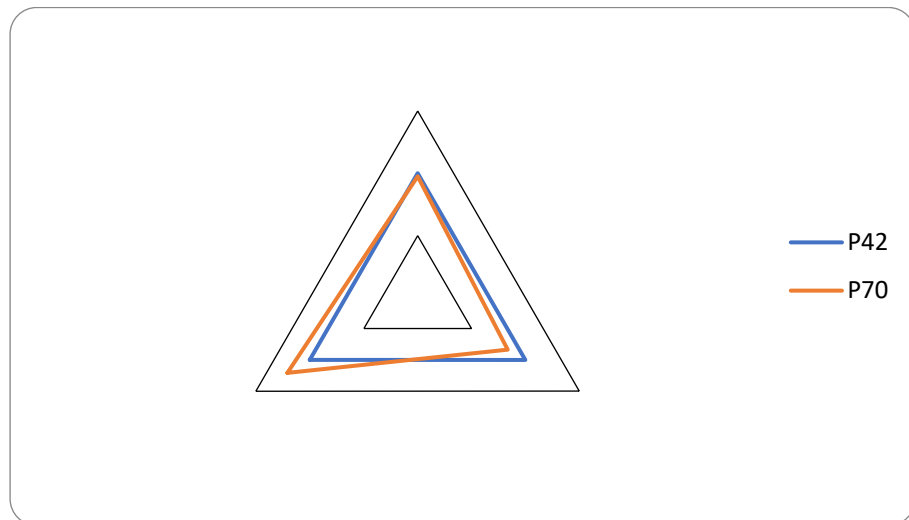


Рис. 22. Возрастные изменения структуры клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ P0-P70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Площадь, занимаемая в корковом веществе пучковой зоной, увеличилась по сравнению с прошлым сроком, но по сравнению с другими группами, это увеличение было наименьшим (рис. 21). Таким образом, пучковая зона у крыс этой группы была статистически значимо меньшей, чем у контрольных животных (рис. 20, табл. 4). Пучковая зона представляла собой тяжи компактно лежащих кортикостероцитов с крупными ядрами и оксифильной цитоплазмой, также выявлялись нарушения citoархитектоники клеток в виде горизонтальной и тангенциальной ориентации трабекул. У 70% крыс выявлены очаги кровоизлияний различной давности в наружной части пучковой зоны, о чем свидетельствовали скопления эритроцитов и теней эритроцитов, окруженных клеточным детритом. У 30% встречались участки с повышенной оксифилией цитоплазмы и гиперхромазией ядер клеток. Размеры кортикостероцитов были меньше значений контрольной группы (рис. 20). Просветы капилляров сузились и были заполнены плазмой (рис. 23). Диаметр капилляров был больше значений контрольной группы, но меньше, чем у крыс группы ДДТ Е0-Р70 (рис. 20). Выявлялись скопления в пучковой зоне лимфоцитов и гранулоцитов.

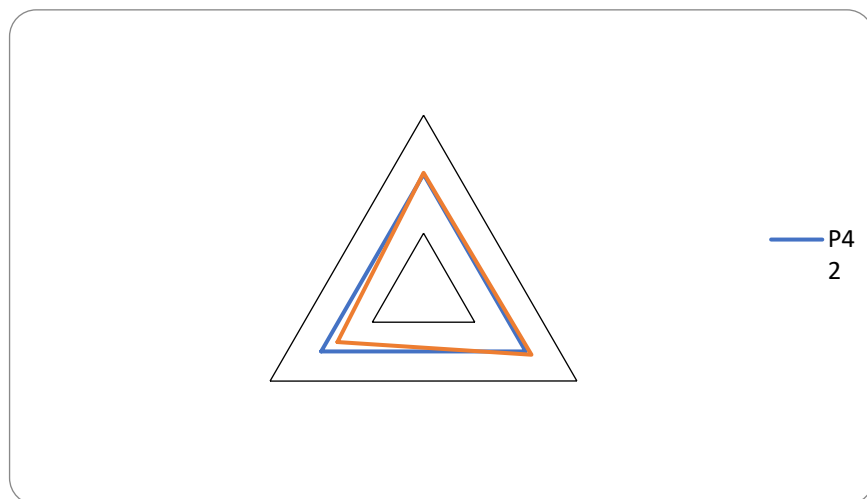


Рис. 23. Возрастные изменения структуры пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ Р0-Р70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Сетчатая зона также имела отличия в строении. Ее площадь в экваториальных срезах не изменялась по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовала значениям контрольной группы (рис. 20, 21). От группы ДДТ Е0-Р70 она отличалась меньшими размерами (рис. 20, табл. 4). У большинства животных сетчатая зона была равномерно распределена в корковом веществе (рис. 27в). Кортикостероциты сетчатой зоны и их ядра уменьшились в размерах по сравнению с 42-ыми сутками и были существенно меньшими по сравнению с контрольной группой и группой ДДТ Е0-Р70 (рис. 20, 24, 30в). Диаметр капилляров хотя и увеличился по сравнению с предыдущим сроком исследования, но имел наименьшее значение в сравниваемых группах (рис. 20, 24). Количество клеток в срезе сетчатой зоны незначительно увеличилось и не имело отличий ни от контрольных значений, ни от значений группы ДДТ Е0-Р70 (рис. 20, 24, табл. 4). В единичных случаях наблюдались кровоизлияния в сетчатой зоне и очаговое отсутствие сетчатой зоны. На границе мозгового вещества выявлялись скопления клеток по структуре схожих с кортикостероцитами пучковой зоны, но не имеющих характерной ориентации в срезе надпочечника (рис. 30г).

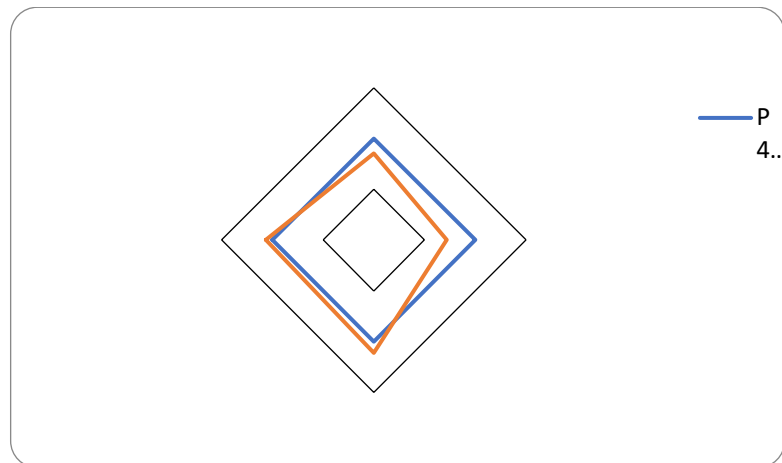


Рис. 24. Возрастные изменения структуры сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс группы ДДТ Р0-Р70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

Соотношение площадей клубочковой, пучковой, сетчатой и промежуточной зон у крыс группы ДДТ Р0-Р70 отличалось от контрольных значений более высоким процентом клубочковой и более низким процентом пучковой и промежуточной зон, а от значений группы ДДТ Е0-Р70 – большим процентом клубочковой и меньшим процентом сетчатой и промежуточной зон (рис.25).

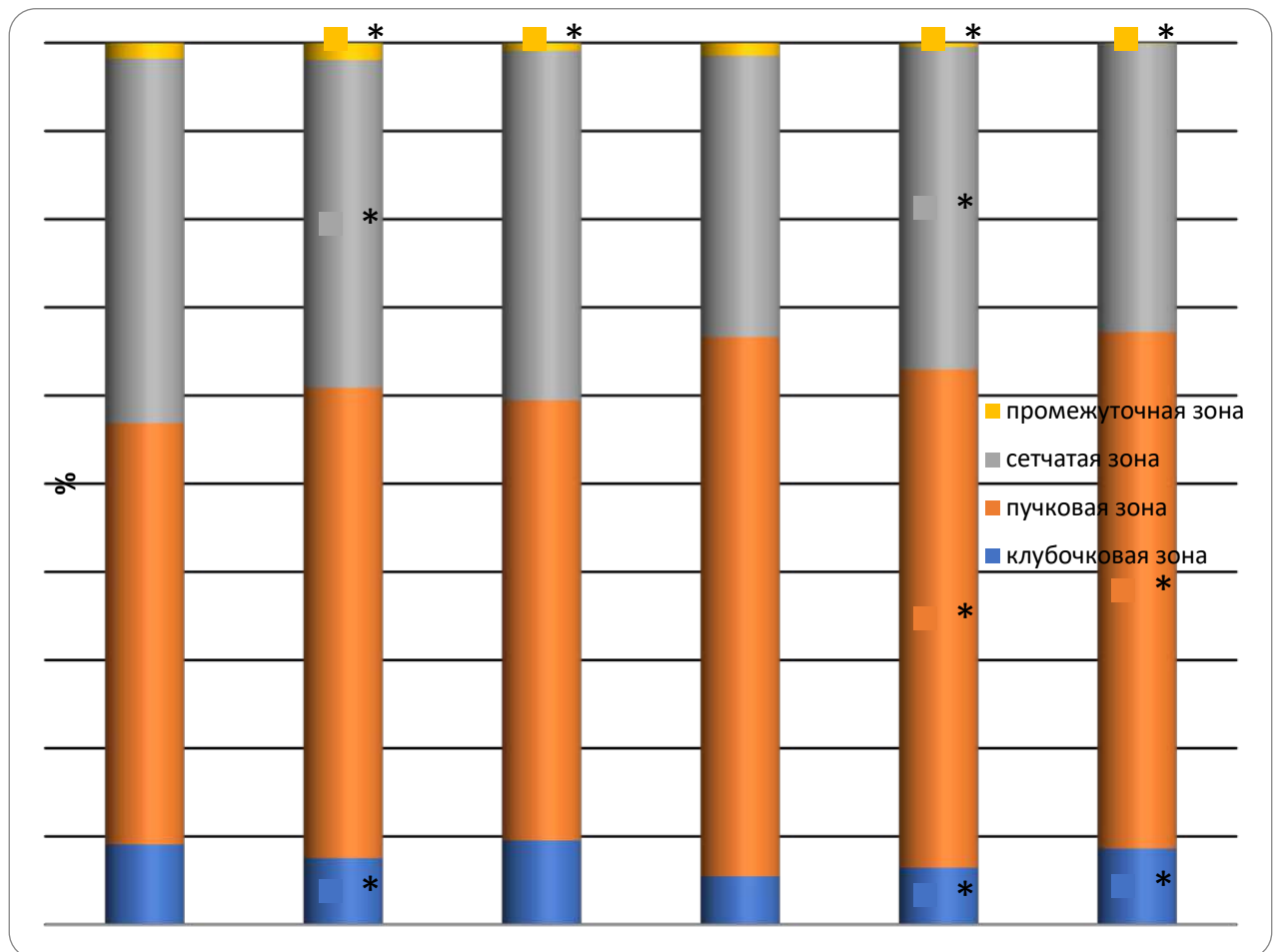


Рис. 25. Соотношение структурно-функциональных зон в корковом веществе надпочечника крыс контрольной группы и опытных групп на 42-ые и 70-ые сутки постнатального онтогенеза.

Примечания: * - статистически значимые отличия от контрольной группы.

Мозговое вещество имело структуру, аналогичную таковой у крыс контрольной группы (рис. 27в). Площадь мозгового вещества и площадь хромофинных клеток в срезе мозгового вещества соответствовали значениям контрольной группы и были статистически значимо большими, чем у крыс группы

ДДТ Е0-Р70 (рис. 20, 26, табл. 4). Однако хромаффинные клетки значительно уменьшились в размерах по сравнению с предыдущим сроком и имели наименьшую площадь в сравниваемых группах (рис. 20, 26, 31в). Размеры их ядер также были меньше контрольных значений (рис. 20), встречались пикнотически измененные клетки. Хромаффинные клетки, как правило, имели базофильную цитоплазму (рис. 31в).

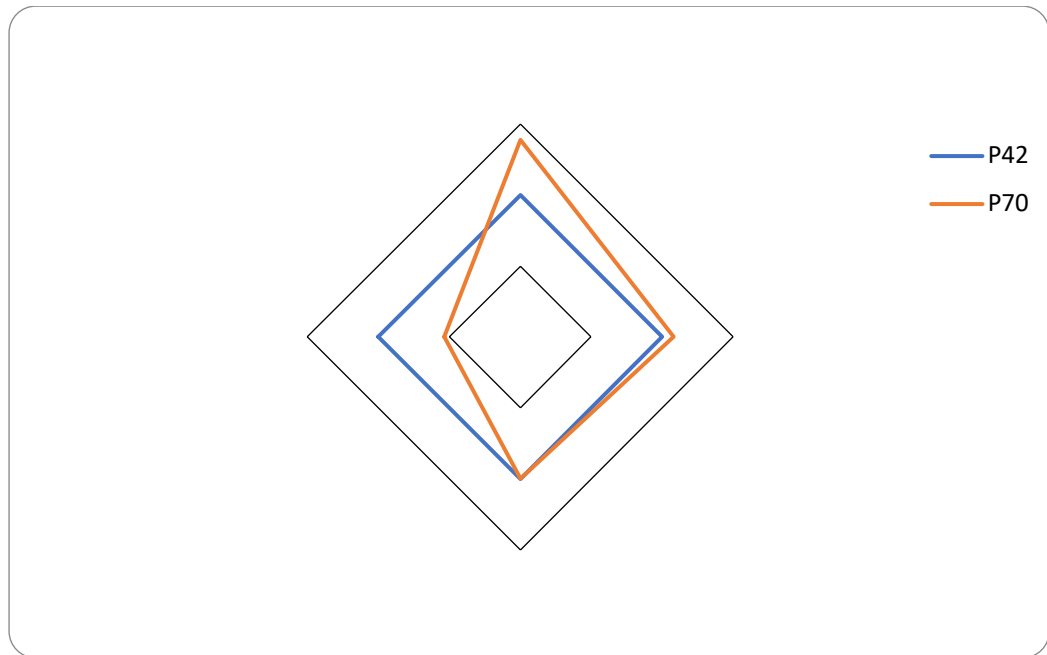


Рис. 26. Возрастная динамика основных параметров строения мозгового вещества надпочечника крыс группы Р0-Р70.

Примечания: Значения параметров на 42-ые сутки постнатального развития приняты за единицу, # – отличия на 70-ые сутки постнатального развития от 42-ых суток.

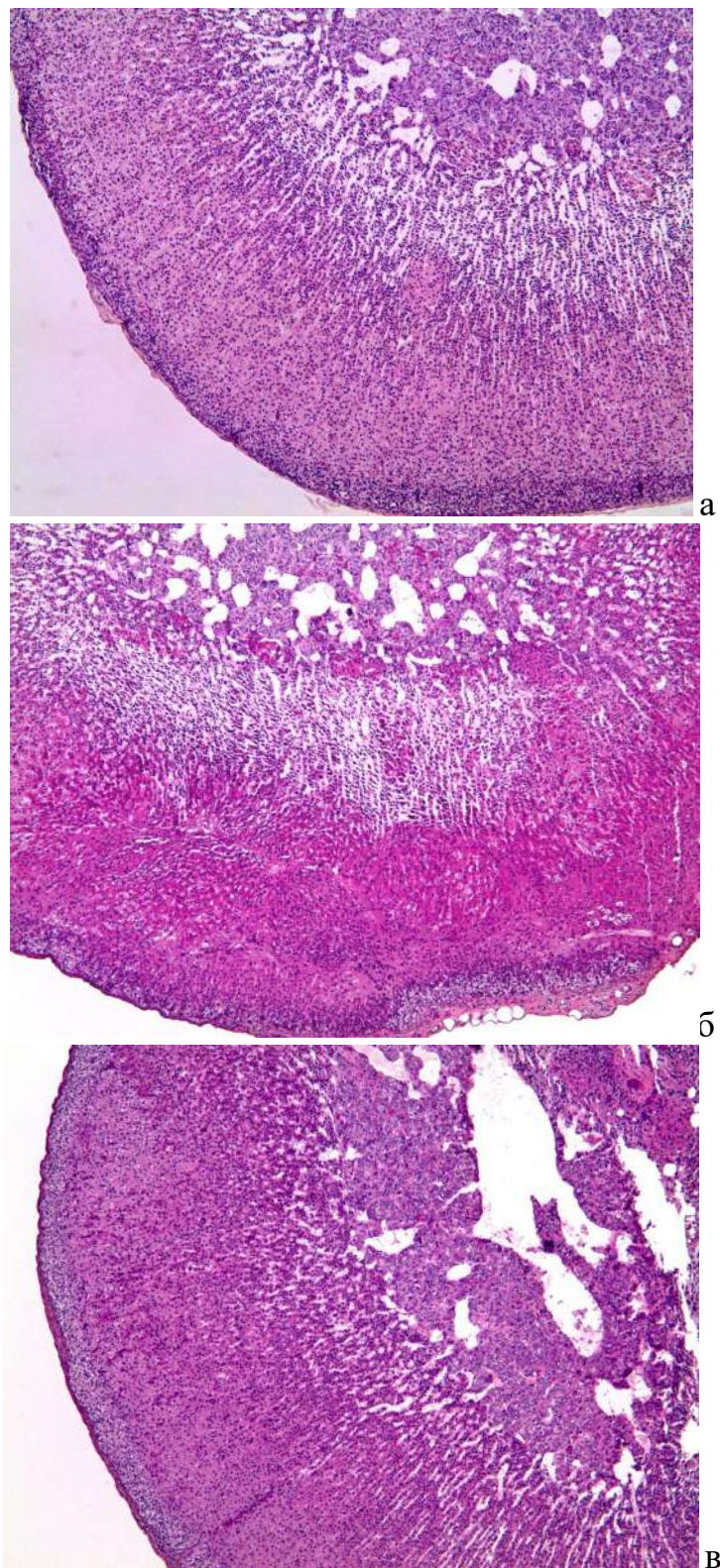


Рис. 27. Строение надпочечника крыс на 70-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р70 (б) и Р0-Р70 (в). Клубочковая зона в опытных группах более развита. В группе ДДТ Е0-Р70 сетчатая зона имеет большие размеры, мозговое вещество развито слабее. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 50.

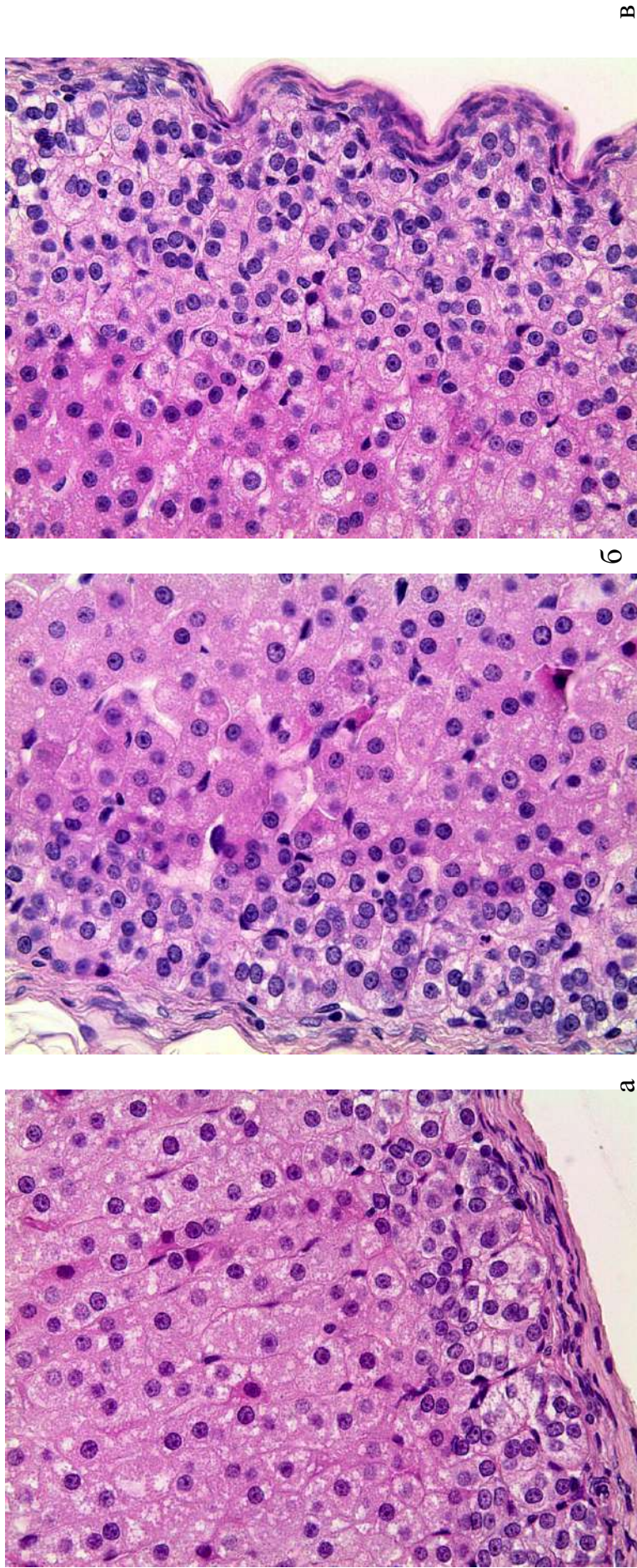


Рис. 28. Строение клубочковой и пучковой зон коркового вещества надпочечника крыс на 70-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды E0-P42 (б) и R0-P42 (в).

У крыс контрольной группы клубочковая зона истончена, у крыс группы ДДТ E0-P42 клубочковая зона более развита, капилляры пучковой зоны расширены, у крыс группы ДДТ R0-P42 клубочковый слой имеет наибольшую толщину, но клетки имеют меньшие размеры.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

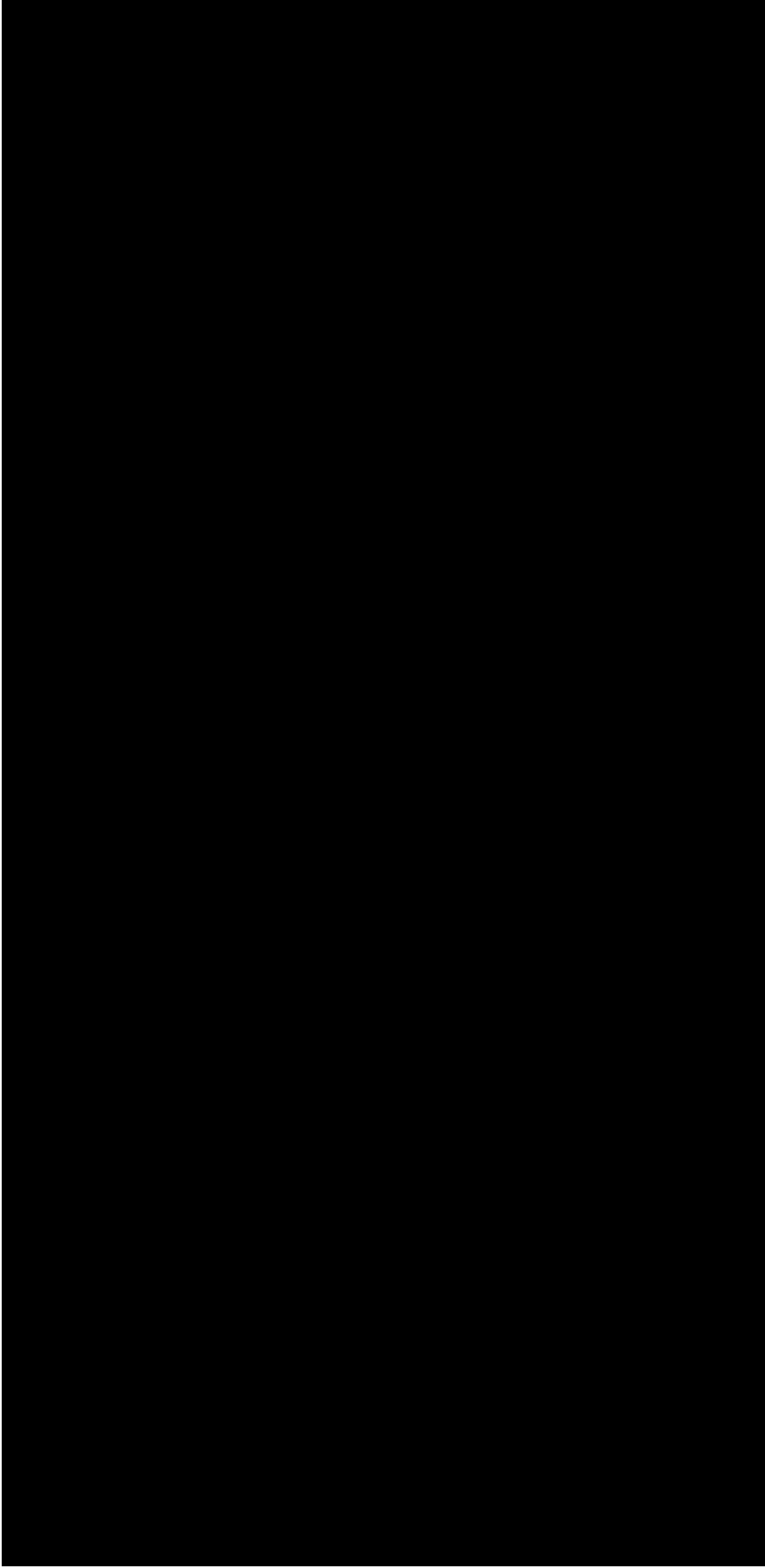


Рис. 29. Изменения в пучковой зоне надпочечников крыс группы ДДТ Е0-Р70.

а – участки дискомплексации на границе с клубочковой зоной, оксифилия цитоплазмы клеток, расширение сосудов микроциркуляторного русла, стазы эритроцитов; б – расширение капилляров, стаз эритроцитов, очаговое кровоизлияние и гибель кортикостероцитов (указано стрелкой); в – дистрофические изменения, появление гибнущих кортикостероцитов (указано стрелками); г – цитолиз, образование детрита, лейкоцитарная инфильтрация отсутствуют; д – появление лимфоцитарных инфильтратов; е – расширение капилляров, миграция лейкоцитов, их экстравазация, формирование зон лейкоцитарной инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином, ув.400.

а

б

в

г

Рис. 30. Строение сетчатой зоны надпочечников крыс на 70-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды Е0-Р42 (б) и Р0-Р42 (в, г).

а – кортикостероциты сетчатой зоны небольшого размера со слабооксифильной цитоплазмой; б – сетчатая зона имеет менее плотное строение, кортикостероциты более крупные с резко оксифильной цитоплазмой; в – сетчатая зона представлена компактно расположенными кортикостероцитами меньшего размера с более крупные со слабо оксифильной цитоплазмой; г – на границе коркового и мозгового вещества скопления клеток, не формирующих ни сетчатых, ни трабекулярных структур, в центре очаг цитолиза.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

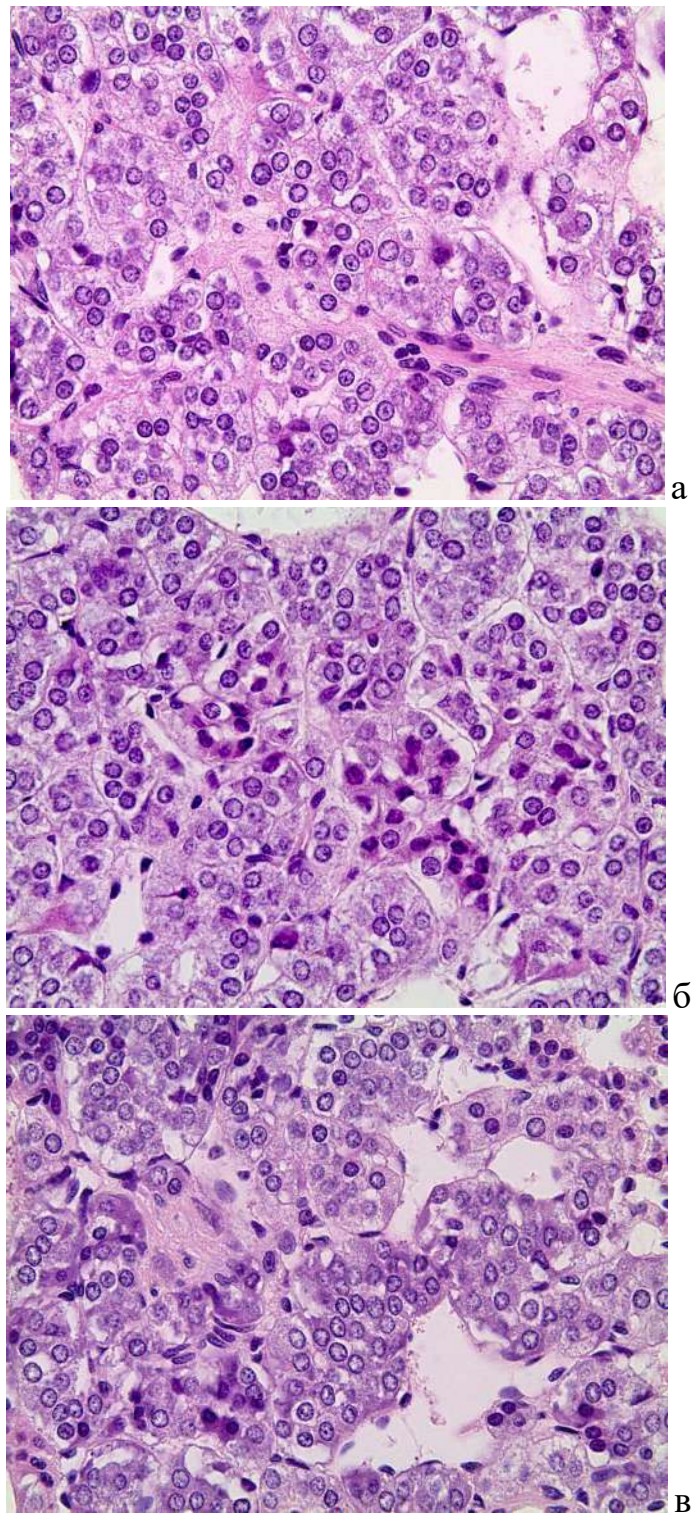


Рис. 31. Строение мозгового вещества надпочечников крыс на 70-ые сутки постнатального развития контрольной группы (а), подвергавшихся воздействию ДДТ в периоды E0-P42 (б) и P0-P42 (в).

а – хромаффинные клетки с умеренно базофильной цитоплазмой разделены соединительнотканными перегородками, просветы венозных синусоидов свободны; б – появление клеток с резкой базофилией цитоплазмы и пикнозом ядер; в – хромаффинные клетки меньшего размера. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Табл. 4.

Морфологические характеристики надпочечников крыс контрольной группы (P70) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в постпубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели	Группы	ДДТ	
	Контрольная P70	E0-P70	P0-P70
Относительная масса надпочечника, %	0,0084 $\pm$ 0,0002	0,0074 $\pm$ 0,003*	0,0083 $\pm$ 0,0003♦#
Диаметр надпочечника, мкм	2921,00 $\pm$ 46,49#	2977,80 $\pm$ 90,83#	2957,50 $\pm$ 43,92#
Толщина коркового вещества, мкм	999,50 $\pm$ 31,94#	1052,40 $\pm$ 56,25#	921,33 $\pm$ 19,56*♦#
Площадь коркового вещества, мкм ²	5996000,00 $\pm$ 186714,45#	6509800,00 $\pm$ 333444,01#	5495700,00 $\pm$ 263766,67*♦#
Доля площади коркового вещества, %	87,99 $\pm$ 0,44	91,46 $\pm$ 1,19*#	87,91 $\pm$ 0,03♦
Площадь мозгового вещества, мкм ²	812000,00 $\pm$ 8315,22#	598200,00 $\pm$ 45313,12*	757000,00 $\pm$ 41000,00♦
Площадь клубочковой зоны, мкм ²	329900,00 $\pm$ 20561,27#	419260,00 $\pm$ 31902,50*#	462550,00 $\pm$ 83,33*
Площадь пучковой зоны, мкм ²	3676250,00 $\pm$ 151469,26#	3676100,00 $\pm$ 200690,28#	3224600,00 $\pm$ 179000,00*#
Площадь сетчатой зоны, мкм ²	1906000,00 $\pm$ 26079,55	2387400,00 $\pm$ 145585,96*#	1803000,00 $\pm$ 103000,00♦
Площадь промежуточной зоны, мкм ²	83850,00 $\pm$ 11395,63	27140,00 $\pm$ 5212,11*#	6050,00 $\pm$ 216,67*♦#
Доля площади клубочковой зоны в корковом веществе, %	5,46 $\pm$ 0,17#	6,45 $\pm$ 0,43*	8,62 $\pm$ 0,45*♦
Доля площади пучковой зоны в корковом веществе, %	61,18 $\pm$ 0,62#	56,61 $\pm$ 1,34*	58,57 $\pm$ 0,23*#
Доля площади сетчатой зоны в корковом веществе, %	31,91 $\pm$ 0,56#	36,58 $\pm$ 0,98*	32,72 $\pm$ 0,18♦#

Доля площади промежуточной зоны в корковом веществе, %	1,45±0,24	0,46±0,10*#	0,10±0,03*♦#
Количество кортикостероцитов в 1мм ² сетчатой зоны	7585,00±330,81	5982,00±154,64*	8070,00±525,15♦
Общее количество кортикостероцитов в срезе сетчатой зоны	14457,01±1373,42	14281,43±599,82#	14551,21±945,76
Диаметр капилляров клубочковой зоны, мкм	1,93±0,02#	2,14±0,10#	2,77±0,11*♦#
Диаметр капилляров пучковой зоны, мкм	2,39±0,05#	3,33±0,16*	2,80±0,13*♦#
Диаметр капилляров сетчатой зоны, мкм	12,33±0,35#	12,49±0,44#	10,97±0,37*♦#
Общая площадь хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества, мкм ²	578850,00±21767,91#	394938,00±46496,07*	544700,00±19100,00♦
Доля хромаффинных клеток в площади мозгового вещества, %	71,06±3,18	66,43±1,18#	72,64±1,41♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы, ♦ – группы P0-P42 от группы E0-P42, # – от предыдущего срока исследования.

Заключение.

У крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатально развития надпочечник увеличился в размерах. Соотношение коркового и мозгового вещества не изменилось. В корковом веществе уменьшились площади клубочковой и сетчатой зон и размеры их клеток, и увеличились площадь пучковой зоны и размеры ее эндокриноцитов. В мозговом веществе размеры хромаффинных клеток уменьшились.

У крыс группы ДДТ Е0-Р70 также происходило увеличение размеров надпочечников. Выявлено увеличение объемов коркового вещества, но не мозгового, вследствие чего соотношение коркового и мозгового вещества отличалось от контрольных животных более высоким процентом коркового. Принципиальным отличием было отсутствие возрастных изменений в структуре коркового вещества и сохранение соотношения клубочковой, пучковой и сетчатой зон как в пубертатном возрасте. В пучковой зоне наблюдались кровоизлияния, дистрофические изменения и цитолиз кортикостероцитов, нарушения цитоархитектоники. Появились лейкоцитарные инфильтраты, но в областях одиночной, а не фокальной гибели клеток некрозов. Хромаффинные клетки увеличились в размерах.

У крыс группы ДДТ Р0-Р70 постнатальный морфогенез характеризовался увеличением массы и размеров органа, увеличением коркового вещества и увеличением мозгового вещества. Соотношение коркового и мозгового вещества было таким же, как у крыс контрольной группы. Структура коркового вещества была более схожей с контрольной группой, но отличалась высоким процентом площади клубочковой зоны вследствие сохранения размеров предыдущего срока исследования. Деструктивные изменения в пучковой и сетчатой зоне были аналогичны предыдущему сроку исследования. Как и в группе ДДТ Е0-Р70 отмечалось появление лейкоцитарных инфильтратов, но не в местах массивной гибели клеток.

3.2. ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НАДПОЧЕЧНИКАХ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ И ТОЛЬКО В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

3.2.1. Изменения канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в надпочечниках крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У крыс контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития в капсуле надпочечника отмечалось накопление β -катенина в цитоплазме у большинства фибробластов, клетки с локализацией β -катенина в ядре в капсуле не выявлялись. Клубочковая зона коркового вещества характеризовалась высокой экспрессией β -катенина кортикостероцитами. Преимущественно β -катенин локализовался на цитоплазматических мембранах (рис. 32а). Накопление β -катенина в цитоплазме было крайне слабо выражено, но клетки с транслоцированным в ядро β -катенином составляли четверть от экспрессирующих этот протеин кортикостероцитов (рис. 35).

В пучковой зоне экспрессия β -катенина характеризовалась неоднородностью. Встречались участки с низким и повышенным количеством β -катенин-позитивных клеток. В основном, β -катенин локализовался на плазмолемме (рис. 36). По сравнению с клубочковой в пучковой зоне находилось больше клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме, но меньшее число клеток с транслокацией транскрипционного фактора в ядро (рис. 32а).

В сетчатой зоне процент β -катенин-позитивных кортикостероцитов соответствовал значениям пучковой зоны. У большинства клеток β -катенин обнаруживался в плазмолемме (рис. 33а). Доля клеток с цитоплазматическим накоплением β -катенина была аналогична значениям пучковой зоны, а с ядерной локализацией – наименьшей в корковом веществе (рис. 37).

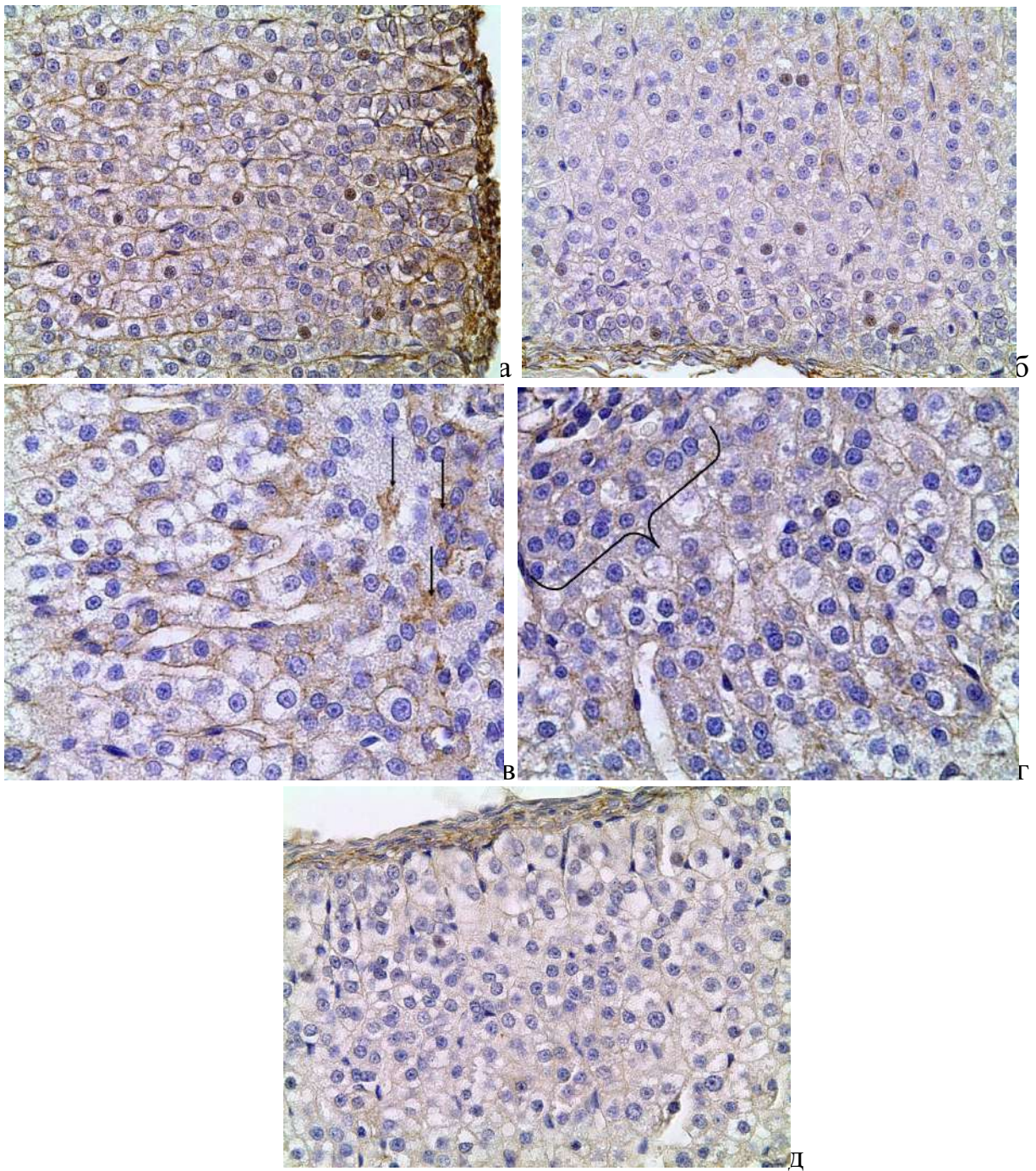


Рис. 32. Изменения экспрессии β -катенина в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста контрольной группы(а), группы ДДТ Е0-Р42 (б, в, г) и группы ДДТ Р0-Р42 (д).

а – высокий уровень экспрессии β -катенина с преимущественной локализацией в составе плазматических мембран; б, д – пониженная экспрессия β -катенина у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ; в – единичные клетки с накоплением β -катенина в цитоплазме в участках дисконкомплексации пучковой зоны (указаны стрелками); г – появление в участках дисконкомплексации β -катенина в составе клеточных мембран (участок указан скобкой).

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400 (а,б,д) и 600 (в,г).

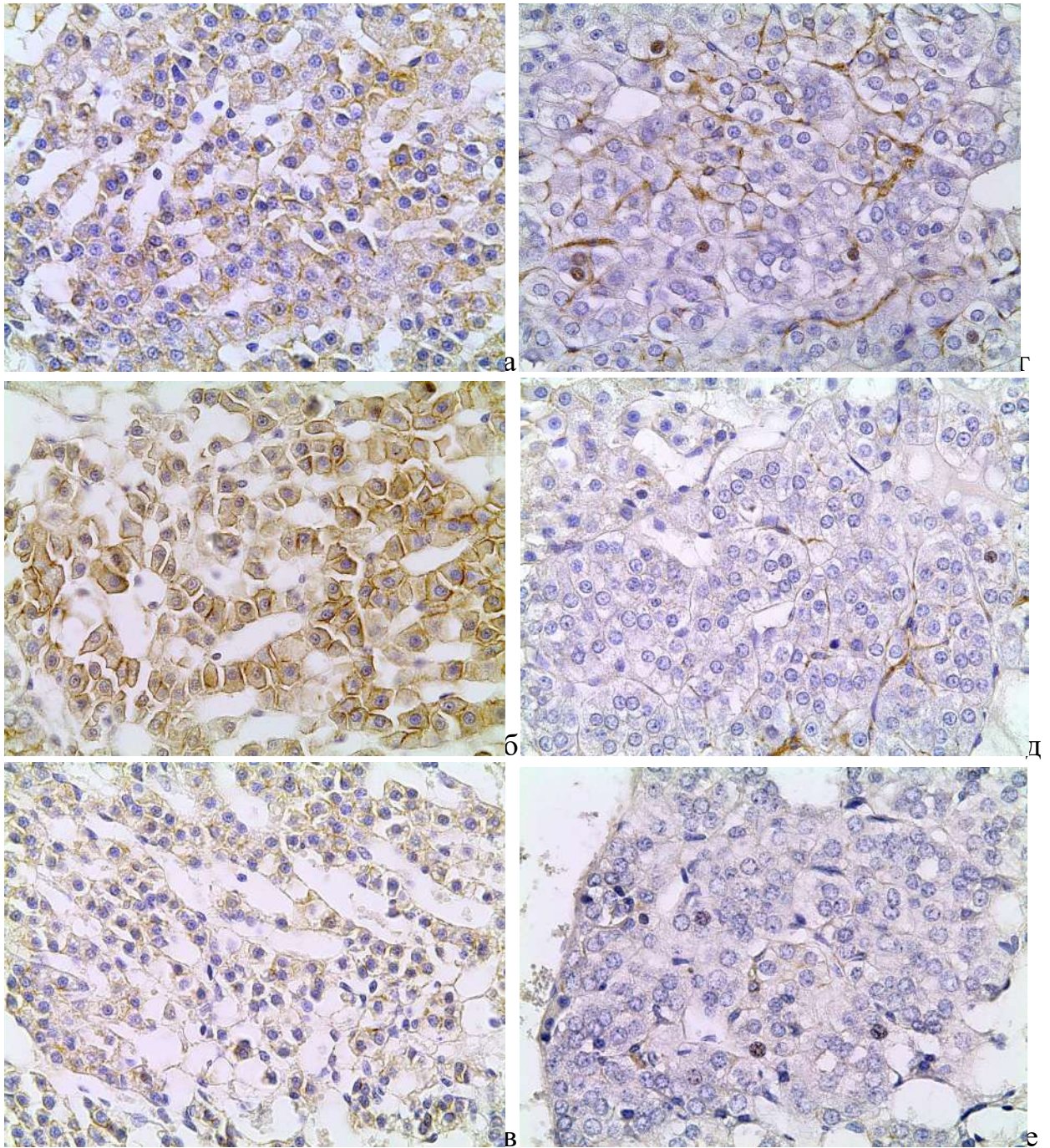


Рис. 33. Изменения экспрессии β -катенина в сетчатой зоне коркового вещества и мозговом веществе надпочечников крыс пубертатного возраста контрольной группы (а, г, соответственно), группы ДДТ Е0-Р42 (б, д) и группы ДДТ Р0-Р42 (в, е).

а – характерна преимущественно мембранная локализация β -катенина;

б – активация цитоплазматической аккумуляции β -катенина;

в – снижение экспрессии β -катенина кортикостероцитами;

г – хромаффинные клетки с мембранной и ядерной локализацией β -катенина;

д, е – снижение экспрессии β -катенина в мозговом веществе.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

В мозговом веществе отмечался высокий уровень экспрессии β -катенина в фибробластах и эндотелиоцитах капилляров, но не венозных синусоидов. Практически 100% фибробластов и эндотелиоцитов характеризовались активным накоплением β -катенина в цитоплазме. В хромаффинных клетках экспрессия β -катенина была очень низкой. Встречались клетки либо с мембранной, либо с ядерной локализацией β -катенина (рис. 33г, 37).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ Е0-Р42) в капсуле надпочечников подавляющее количество клеток характеризовались накоплением β -катенина в цитоплазме.

Количество кортикостероцитов клубочковой зоны, экспрессирующих β -катенин, было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, но соотношение клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией β -катенина не отличалось от контрольных значений (рис. 32б, 35).

В пучковой зоне доля β -катенин-позитивных клеток была почти в два раза меньше контрольных значений, отмечалось пропорциональное уменьшение клеток с ядерной, цитоплазматической и мембранной локализацией β -катенина (рис. 36). В участках дисконфлексии пучковой зоны в одних случаях встречались единичные клетки с цитоплазматической локализацией, в других случаях – с мембранной локализацией β -катенина (рис. 32в, г).

Кортикостероциты сетчатой зоны характеризовались повышенной экспрессией β -катенина по сравнению с клетками пучковой зоны. Процент позитивных клеток превышал значения контрольной группы в 1,5 раза за счет увеличения числа клеток с мембранной и цитоплазматической локализацией (рис. 33б), однако процент клеток с ядерной локализацией β -катенина был статистически значимо меньшим (рис. 37).

В мозговом веществе, как и у контрольных животных, фибробласты и эндотелий капилляров активно накапливали β -катенин в цитоплазме. Хромаффинные клетки отличались пониженной экспрессией β -катенина. β -катенин выявлялся либо на цитоплазматических мембранах, либо в ядре (рис. 33д, 38).

В группе крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном онтогенезе (ДДТ Р0-Р42), экспрессия β -катенина в фибробластах капсулы была менее выражена, в клубочковой зоне количество β -катенин-позитивных клеток было статистически значимо меньшим, чем в контрольной группе и группе ДДТ Е0-Р42 (рис. 32д, 34). Уменьшение β -катенин-позитивных клеток было связано в первую очередь с сокращением численности кортикостероцитов с мембранной локализацией этого белка. Как и в группе ДДТ Е0-Р42 отмечалось увеличение процента кортикостероцитов с цитоплазматической локализацией β -катенина и уменьшение доли клеток с транслокацией β -катенина в ядро (рис. 34). Таким образом, в группе ДДТ Р0-Р42 выявлены максимальные изменения в экспрессии β -катенина кортикостероцитами клубочковой зоны, проявлявшиеся превалированием накопления этого транскрипционного фактора в цитоплазме и транслокации его в ядро.

В пучковой зоне доля β -катенин-позитивных кортикостероцитов была вдвое меньше контрольных значений и не отличалась от значений группы ДДТ Е0-Р42. Отмечалось снижение численности клеток с мембранной и в меньшей степени с ядерной локализацией β -катенина (рис. 32д, 35). Соотношение клеток с различной локализацией β -катенина отличалось от контрольной группы и группы ДДТ Е0-Р42 в сторону увеличения частот с цитоплазматической и ядерной локализацией.

В сетчатой зоне коркового вещества процент β -катенин-позитивных кортикостероцитов был меньше контрольных значений (рис. 33в). Отмечалось пропорциональное уменьшение долей клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией β -катенина (рис. 36).

В мозговом веществе фибробласты и эндотелий капилляров характеризовались высоким содержанием β -катенина в цитоплазме. Хромаффинные клетки отличались пониженной экспрессией β -катенина (рис. 33е). β -катенин выявлялся либо на цитоплазматических мембранах, либо в ядре, как и у крыс группы ДДТ Е0-Р42 (рис. 37).

Заключение. У крыс контрольной группы экспрессия β -катенина была выше в корковом, нежели в мозговом веществе, и отличалась различной выраженностью в зонах коркового вещества. Наиболее интенсивно β -катенин экспрессировался в клубочковой и сетчатой зонах. Транслокация β -катенина в ядро, необходимая для активации канонического Wnt-сигналинга, уменьшалась от клубочковой к сетчатой зоне. Активно этот процесс протекал и в хромаффинных клетках.

У крыс группы ДДТ E0-P42 и ДДТ P0-P42 различия в экспрессии β -катенина в корковом и мозговом веществе были сохранены, но отличались от контрольных значений. У крыс группы ДДТ E0-P42 выявлены уменьшение β -катенин-позитивных клеток в клубочковой и пучковой зонах, хромаффинных клетках и увеличение в сетчатой зоне. В сетчатой зоне усиливались процессы накопления β -катенина в цитоплазме кортикостероцитов. В мозговом веществе резко снизилось число клеток с β -катенин-позитивной плазмолеммой.

У крыс группы ДДТ P0-P42 в клубочковой и пучковой зонах происходили сходные изменения. Активация канонического Wnt-сигналинга в клетках клубочковой зоны была более выражена, чем в предыдущей группе, а в пучковой не имела существенных различий. Наибольшие отличия наблюдались в экспрессии β -катенина в клетках сетчатой зоны. Она была снижена по сравнению с контрольными значениями, что отличало крыс, потреблявших низкие дозы ДДТ в постнатальном онтогенезе от крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию дисраптора. Процессы накопления β -катенина и транслокации его в ядро были слабо выражены. В мозговом веществе не наблюдалось подавления активации канонического Wnt.

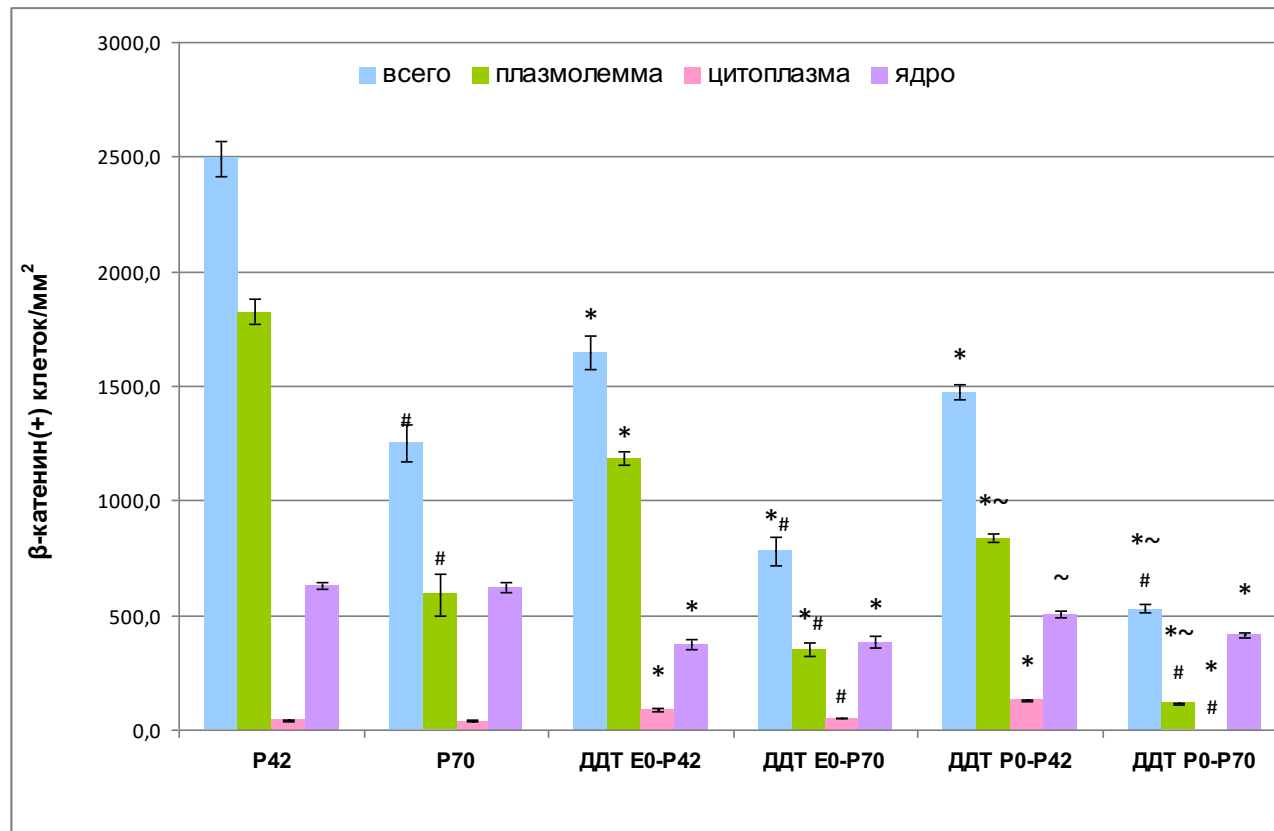


Рис. 34. Изменения общей численности β -катенин-позитивных кортикостероцитов и кортикостероцитов с различной субклеточной локализацией β -катенина в клубочковой зоне надпочечников крыс в пубертатном (P42) и постпубертатном (P70) периодах у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в течение пре- и постнатального развития и только постнатального развития ($M \pm m$).

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

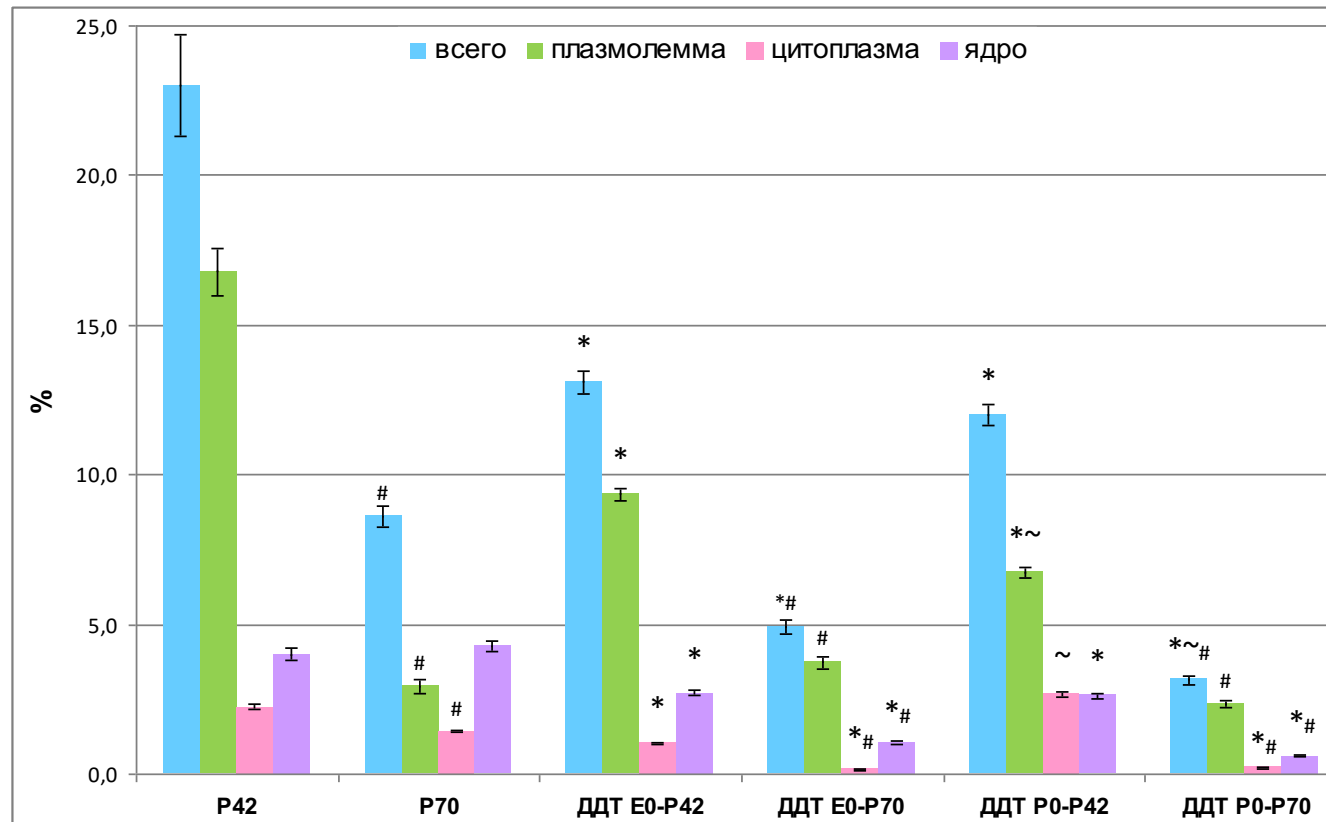


Рис. 35. Изменения процентного содержания β -катенин-позитивных кортикостероцитов и кортикостероцитов с различной субклеточной локализацией β -катенина в пучковой зоне надпочечников крыс в пубертатном (P42) и постпубертатном (P70) периодах у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в течение пре- и постнатального развития и только постнатального развития ($M \pm m$)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

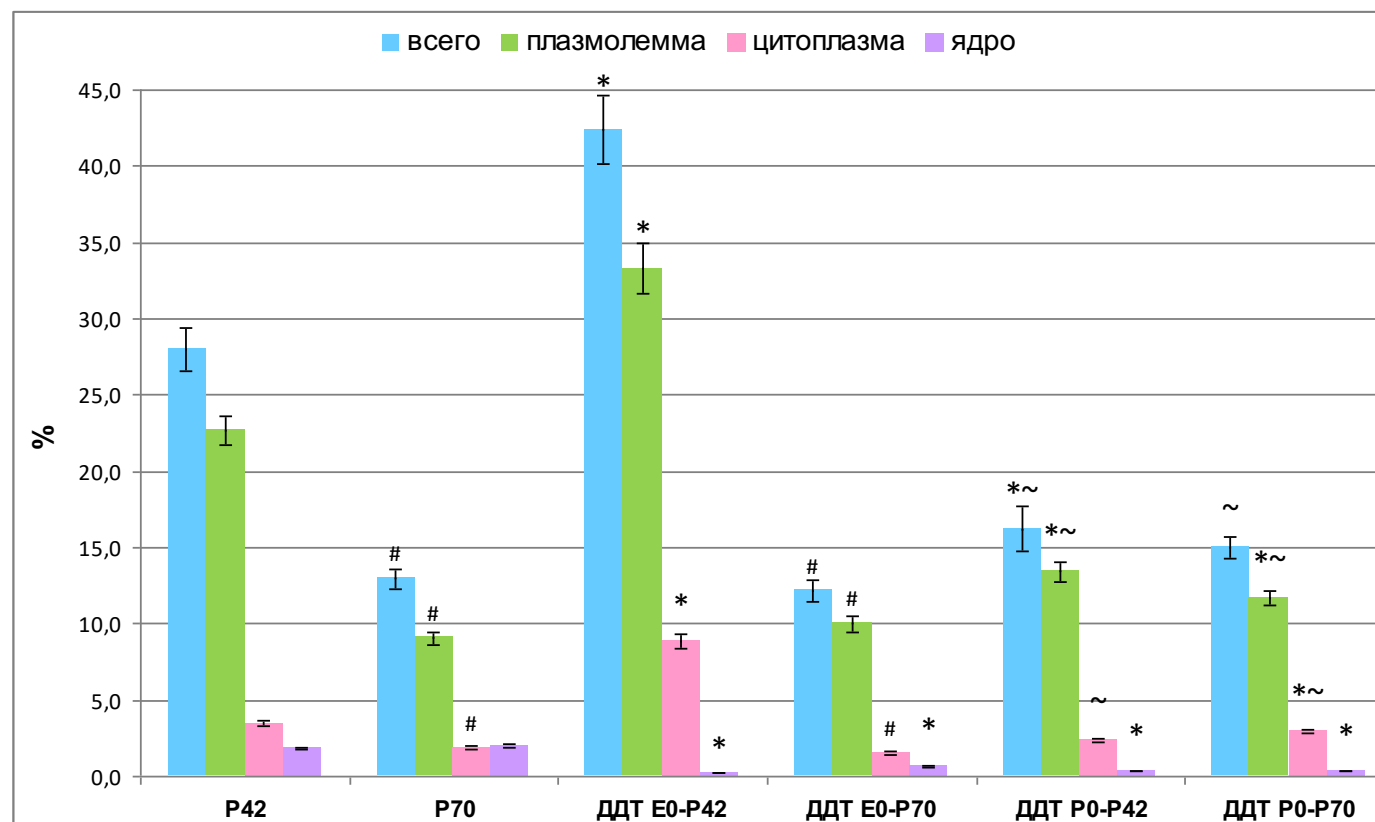


Рис. 36. Изменения процентного содержания β-катенин-позитивных кортикостероцитов и кортикостероцитов с различной субклеточной локализацией β-катенина в сетчатой зоне надпочечников крыс в пубертатном (P42) и постпубертатном (P70) периодах у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в течение пре- и постнатального развития и только постнатального развития ($M \pm m$)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

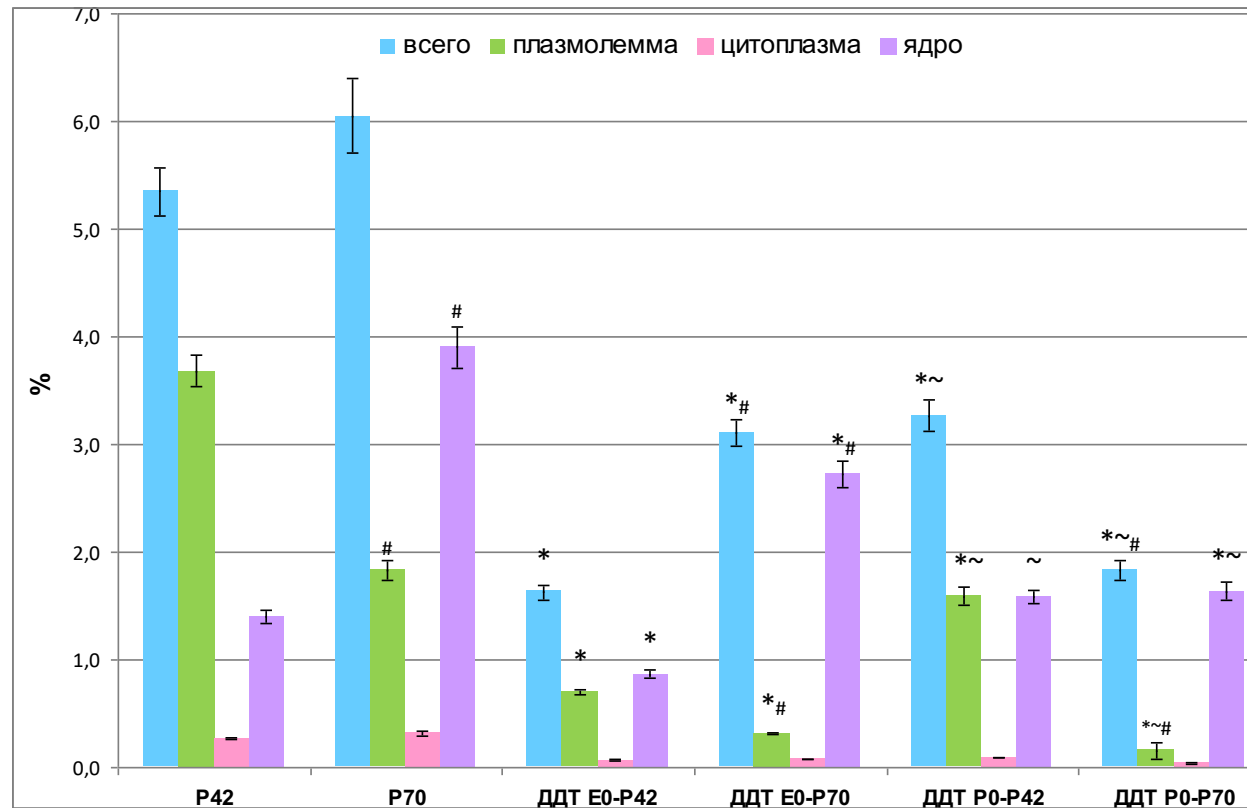


Рис. 37. Изменения процентного содержания β-катенин-позитивных хромаффинных клеток и хромаффинных клеток с различной субклеточной локализацией β-катенина в мозговом веществе надпочечников крыс в пубертатном (P42) и постпубертатном (P70) периодах у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в течение пре- и постнатального развития и только постнатального развития ($M \pm m$)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

3.2.2. Изменения канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в надпочечнике крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У крыс контрольной группы после наступления половой зрелости экспрессия β -катенина фибробластами капсулы надпочечника не имела отличий от пубертатного периода. Содержащиеся в капсуле фибробласты характеризовались высоким содержанием β -катенина в цитоплазме. В клубочковой зоне количество выявляемых β -катенин-позитивных клеток уменьшилось вдвое по сравнению с предыдущим сроком исследования. Особенностью возрастных изменений экспрессии β -катенина в кортикостероцитах клубочковой зоны было уменьшение процента клеток с мембранной локализацией и сохранение на неизменном уровне процента клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме и транслокацией его в ядро, вследствие чего половину всех β -катенин-позитивных клеток составляли клетки с транслоцированным в ядро транскрипционным фактором (рис. 34, 38а).

В пучковой зоне общее количество β -катенин-позитивных клеток уменьшилось почти в три раза по сравнению с предыдущим сроком исследования. Особенности уменьшения числа клеток с различной локализацией β -катенина были такими же, как и в кортикостероцитах клубочковой зоны: уменьшалось число клеток с мембранной локализацией β -катенина, а доля клеток с накоплением его в цитоплазме и ядерной локализацией оставалось на прежнем уровне (рис. 35, 38а).

Аналогичные изменения наблюдались и в сетчатой зоне коркового вещества. Доля β -катенин-позитивных клеток уменьшилась вдвое, и так же за счет клеток с мембранной локализацией белка (рис. 37, 39а).

В мозговом веществе надпочечников выявлено двукратное уменьшение доли β -катенин-позитивных хромаффинных клеток с локализацией β -катенина в плазмолемме. Доля клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме не изменялась, а с локализацией в ядре увеличилась почти в три раза,

вследствие чего общее количество β -катенин- позитивных клеток не уменьшалось по сравнению с предыдущим сроком исследования. Также отмечалось накопление β -катенина в цитоплазме эндотелиоцитов капилляров и фибробластов (рис. 38, 39г).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ Е0-Р70) в капсуле надпочечников фибробластов с локализацией β -катенина в цитоплазме было меньше, чем в контрольной группе. В клубочковой зоне выявлено двукратное уменьшение числа β -катенин-позитивных клеток, трехкратное уменьшение числа клеток с мембранной локализацией белка по сравнению с предыдущим сроком исследования. В отличие от контрольной группы в группе ДДТ Е0-Р70 выявлено уменьшение доли кортикостероцитов с накоплением β -катенина в цитоплазме. Количество клеток с ядерной локализацией β -катенина не изменялось после наступления половой зрелости, как и у контрольных животных. При сравнении с контрольной группой аналогичного возраста у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, количество кортикостероцитов клубочковой зоны с мембранной и ядерной локализацией β -катенина было статистически значимо меньшим, а с накоплением β -катенина в цитоплазме – большим (рис. 34, 38б).

В пучковой зоне доля β -катенин-позитивных клеток уменьшилась в 2,5 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования. Отмечалось уменьшение процента кортикостероцитов с накоплением β -катенина в цитоплазме и ядре, но в большей степени – с мембранной локализацией β -катенина. В участках дискомплексации пучковой зоны β -катенин-позитивные клетки не обнаруживались. По сравнению с контрольной группой доля клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме и транслокацией его в ядро было статистически значимо значительно меньше. Среди β -катенин-позитивных кортикостероцитов большинство составляли клетки с мембранной локализацией в отличие от контрольной группы (рис. 35, 38б).

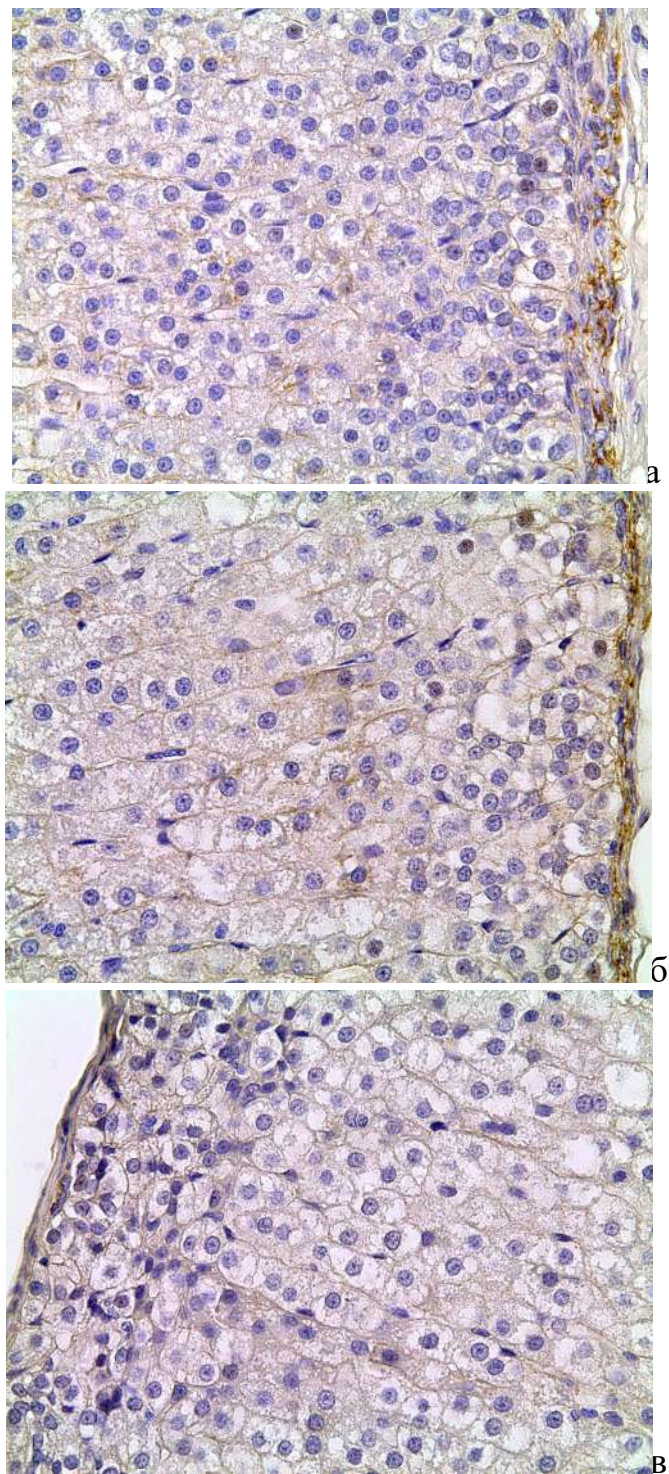


Рис. 38. Изменения экспрессии β -катенина в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества надпочечников крыс постпубертатного возраста контрольной группы(а), группы ДДТ Е0-Р70 (б) и группы ДДТ Р0-Р70 (в). а – β -катенин-позитивные кортикостероциты выявляются в и клубочковой и пучковой зонах; б, в – экспрессия β -катенина кортикостероцитами снижена. Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

В сетчатой зоне выявлено уменьшение содержания β -катенин-позитивных клеток в 3,5 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования. Это было связано с уменьшением числа клеток с мембранной и цито-

плазматической локализацией β -катенина (рис. 36, 39б). Доля клеток с транслоцированным в ядро β -катенином не изменялась. По сравнению с возрастным контролем экспрессия β -катенина в кортикостероцитах сетчатой зоны крыс группы ДДТ Е0-Р70 отличалась только меньшим процентом клеток с ядерной локализацией белка (рис. 36).

В мозговом веществе β -катенин экспрессировался эндотелиоцитами и хромаффинными клетками. Среди иммунопозитивных хромаффинных клеток основную долю составляли клетки с ядерной локализацией β -катенина (рис. 39д). Общая численность β -катенин-позитивных хромаффинных клеток увеличилась вдвое по сравнению с предыдущим сроком исследования за счет клеток с ядерной локализацией β -катенина. По сравнению с контролем выявлено статистически значимое снижение процента клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией β -катенина (рис. 37).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде онтогенеза (ДДТ Р0-Р70), как и у крыс группы ДДТ Е0-Р70 в капсуле надпочечника фибробласты характеризовались меньшим накоплением β -катенина в цитоплазме по сравнению с контрольной группой. Выявлено трехкратное уменьшение процента β -катенин-позитивных клеток в клубочковой зоне коркового вещества надпочечников по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 34, 38в). Столь выраженное уменьшение было связано с семикратным снижением числа кортикостероцитов с мембранной локализацией β -катенина и отсутствием клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме. Численность кортикостероцитов с транслокацией β -катенина в ядро уменьшилась в значительно меньшей степени. Они составляли три четверти от всех β -катенин-позитивных клеток. Процент β -катенин-позитивных клеток в клубочковой зоне коркового вещества в данной группе был статистически значимо меньшим по всем показателям в сравнении с контрольной группой (рис. 34). По сравнению с группой ДДТ Е0-Р70 доля β -катенин-позитивных клеток также была статистически значимо меньшей, но это было обусловлено более выраженным уменьшением числа клеток с мембранной и

цитоплазматической локализацией белка. Процент клеток с транслоцированным в ядро β -катенином в опытных группах не имел значимых различий.

В пучковой зоне коркового вещества надпочечника у крыс группы ДДТ Р0-Р70 доля клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией значительно уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 35, 38в). Наиболее выраженным было уменьшение процента клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме. По сравнению со значениями контрольной группы аналогичного возраста выявлено уменьшение процента клеток, накапливающих β -катенин в цитоплазме, и клеток с ядерной локализацией β -катенина, доля кортикостероцитов с мембранной локализацией не отличалась (рис. 35). По сравнению с группой ДДТ Е0-Р70 выявлено уменьшение процента β -катенин-позитивных клеток, в основном за счет меньшего содержания клеток с мембранной локализацией. Как и в группе ДДТ Е0-Р70 участки дискомлексации пучковой зоны также были иммунонегативными.

В сетчатой зоне коркового вещества у крыс группы ДДТ Р42-Р70 показатели экспрессии β -катенина кортикостероцитами не изменялись по сравнению с предыдущим сроком исследования в отличие от контрольной группы и группы ДДТ Е0-Р70. По сравнению с контрольной группой выявлено меньшее содержание клеток с транслокацией β -катенина в ядро. Доля клеток с мембранной и цитоплазматической локализацией превышала контрольные значения (рис. 37, 39в). При сравнении двух опытных групп обнаружено большее содержание процента β -катенин-позитивных клеток в группе ДДТ Р0-Р70. Это было связано с увеличением доли клеток с иммунопозитивными мембраной, а также цитоплазмой. Доля клеток с ядерной локализацией β -катенина была меньше (рис. 37).

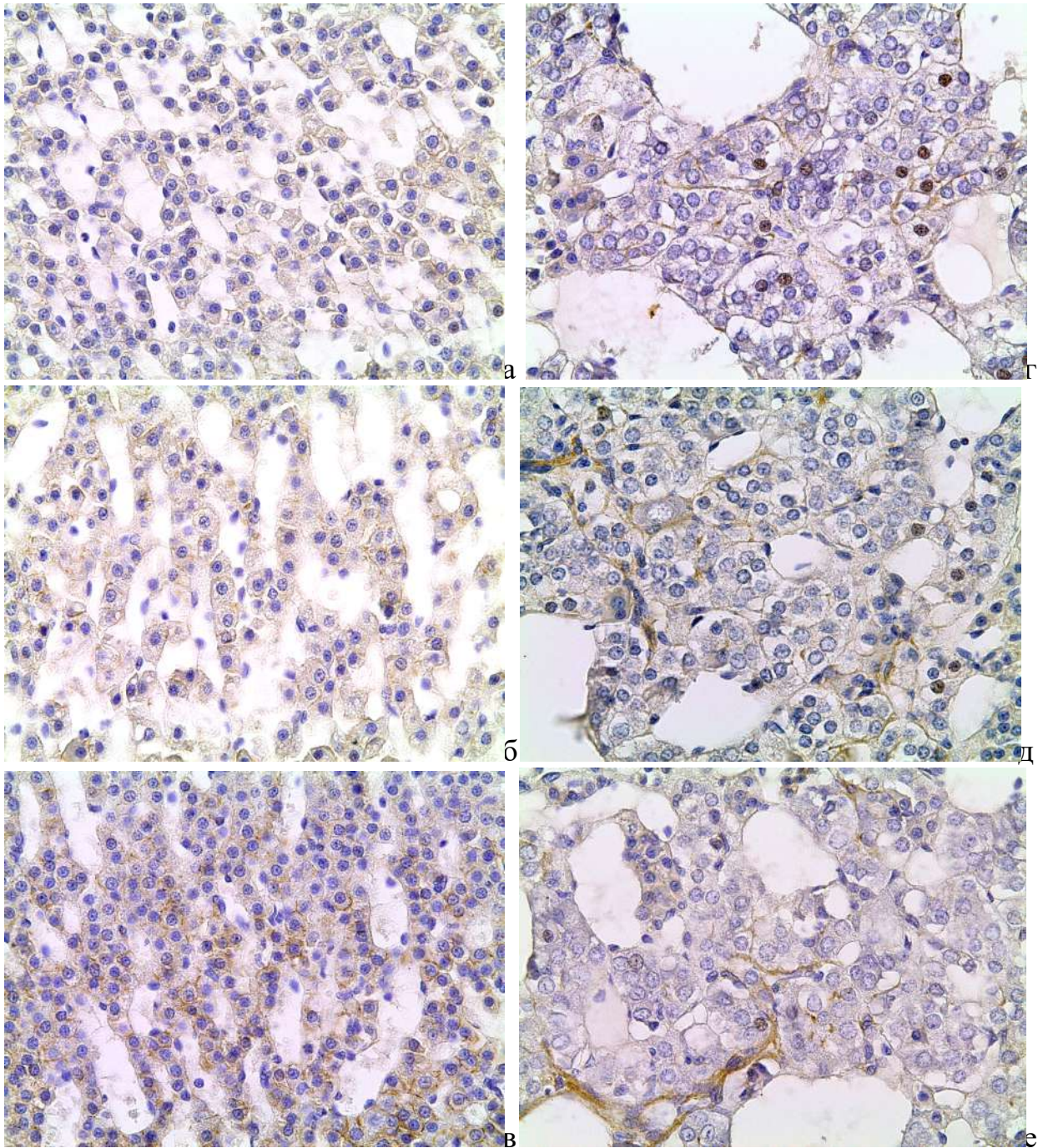


Рис. 39. Изменения экспрессии β -катенина в сетчатой зоне коркового вещества и мозговом веществе надпочечников крыс постпубертатного возраста контрольной группы (а, г, соответственно), группы ДДТ Е0-Р70 (б, д) и группы ДДТ Р0-Р70 (в, е).

а – небольшое содержание β -катенин-позитивных клеток; б – снижение численности клеток с ядерной локализацией β -катенина; в – большее количество клеток с мембранной локализацией β -катенина; г – высокое содержание хромаффинных клеток с ядерной локализацией β -катенина; д, е – пониженное содержание хромаффинных клеток с транслокацией β -катенина в ядро.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

В мозговом веществе надпочечника β -катенин экспрессировался как эндотелием капилляров, так и хромаффинными клетками. В эндотелии практически 100% β -катенин-позитивных клеток характеризовались его цитоплазматическим накоплением, в то время как хромаффинные клетки – транслокацией β -катенина в ядро. Общая численность β -катенин-позитивных хромаффиноцитов уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком исследования за счет уменьшения клеток с мембранной и цитоплазматической локализацией белка (рис. 38, 39е). Абсолютное большинство (почти 90%) β -катенин-позитивных клеток составляли клетки с ядерной локализацией (рис. 38). По сравнению с предыдущим сроком исследования процент клеток с транслокацией β -катенина в ядро не изменялся. По сравнению с контрольной группой и группой ДДТ Е0-Р70 экспрессия β -катенина хромаффинными клетками была значительно уменьшена (рис. 38).

Заключение. У крыс контрольной группы развитие надпочечника сопровождалось уменьшением численности выявляемых β -катенин-позитивных клеток, что было связано с уменьшением его присутствия в мембранах кортикостероцитов. Доля клеток с транслокацией β -катенина в ядро при этом не уменьшалась, а в мозговом веществе увеличивалась.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном периодах, наблюдались схожие процессы в корковом и мозговом веществе. Отличием было уменьшение численности клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме кортикостероцитов коркового вещества и усиление транслокации транскрипционного фактора в ядра хромаффинных клеток. То есть после наступления половой зрелости происходила инактивация Wnt пути в корковом веществе и активация в мозговом. При этом все численные показатели экспрессии β -катенина были ниже контрольных значений.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде, в кортикостероцитах клубочковой и пучковой зон ингибирование экспрессии β -катенина было более выражено. Особенностью было отсутствие возрастных изменений этого процесса в клетках сетчатой зоны. Второй осо-

бенностью были изменения экспрессии β -катенина в хромаффинных клетках. С одной стороны, уменьшалось число клеток с мембранной локализацией белка как в контрольной группе и группе сравнения, но, с другой стороны, не отмечалось усиления процессов транслокации β -катенина в ядро, то есть не наблюдалась активация Wnt в хромаффинных клетках.

3.2.3. Изменения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Nhex эндокриноцитами надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

На 42-ые сутки постнатального развития у крыс контрольной группы в корковом веществе надпочечника PRH/Nhex-позитивные кортикостероциты выявлялись в небольших количествах и имели следующие гистотопографические особенности. PRH/Nhex -позитивные клетки располагались диффузно. Наибольшая численность экспрессирующих PRH/Nhex клеток обнаруживалась в клубочковой зоне, в пучковой зоне их численность была существенно меньше, в сетчатой зоне они не выявлялись (рис. 40а, 41а-в). В мозговом веществе также обнаруживались немногочисленные PRH/Nhex-позитивные хромаффинные клетки (рис. 40г, 41г).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ Е0-Р42), выявлено многократное увеличение численности PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в клубочковой и особенно в пучковой зонах (рис. 40б, 41а, б). Расположение иммунопозитивных клеток было диффузным, как и в контрольной группе. В кортикостероцитах сетчатой зоны экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex не наблюдалась, как и в контроле (рис. 41в). В мозговом веществе отмечалось увеличение доли PRH/Nhex -позитивных хромаффинных клеток (рис. 40д, 41г).

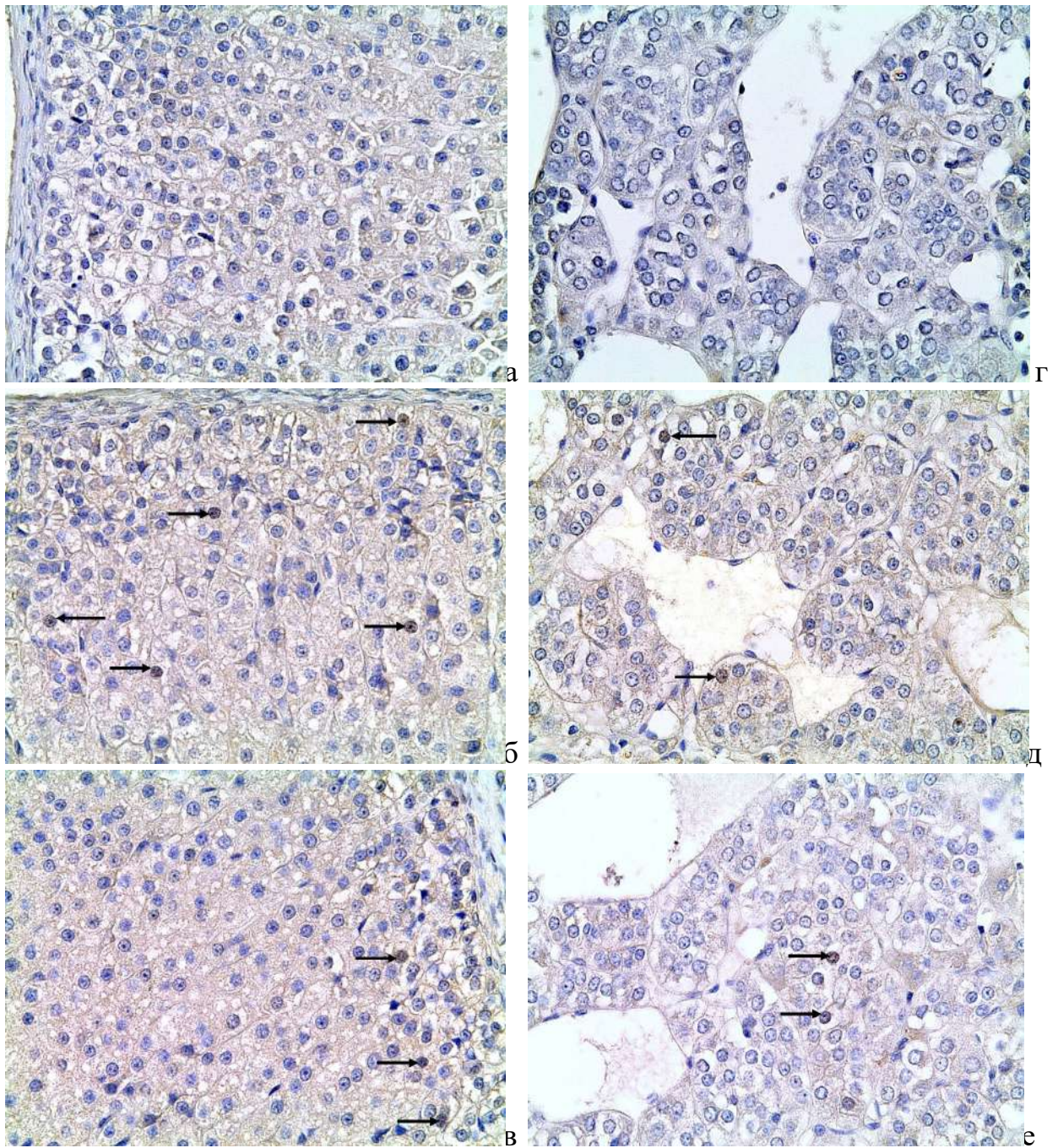


Рис. 40. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex кортикостероидами клубочковой и пучковой зон (а) и хромаффинными клетками (г) у крыс контрольной группы пубертатного возраста, у крыс подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном (б, д) и только в постнатальном периодах онтогенеза (в, е, соответственно). Докраска гематоксилином. Ув. 400.

Примечания: PRH/Nhex-позитивные клетки указаны стрелками.

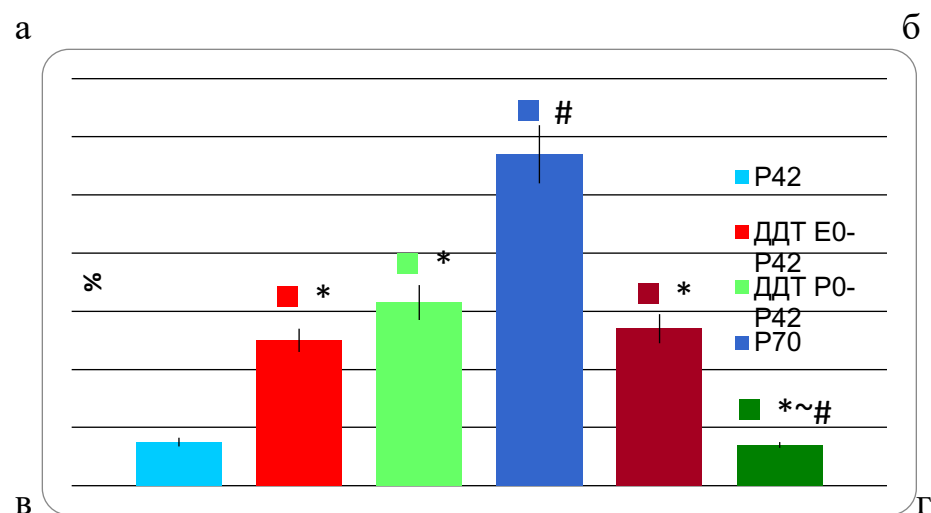


Рис. 41. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex эндокриноцитами клубочковой (а), пучковой (б), сетчатой (в) зон и мозгового вещества (г) надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза ($M \pm m$)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

В группе крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном онтогенезе (ДДТ P0-P42), также выявлено статистически значимое увеличение количества PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в клубочковой и пучковой зонах (рис. 40в, 41а, б). Как и в предыдущей опытной группе отмечалось увеличение процента PRH/Nhex-позитивных хромаффинных клеток (рис. 40е, 41г).

Заключение. У крыс контрольной группы экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex обнаруживалась как в корковом, так и в мозговом веществе. В корковом веществе она обнаруживалась только в клубочковой и пучковой зонах и характеризовалась неоднородностью. У крыс групп ДДТ E0-P42 и ДДТ P0-P42 экспрессия PRH/Nhex активировалась в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества и мозговом веществе.

3.2.4. Изменения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Nhex эндокриноцитами надпочечников крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

На 70-ые сутки постнатального развития у крыс контрольной группы доля PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества значительно увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 41а, б, 42а). В сетчатой зоне появились PRH/Nhex-позитивные клетки (рис. 41в, 42г). В мозговом веществе процент Nhex-позитивных хромаффинных клеток существенно повысился (рис. 41г, 43а).

У крыс группы ДДТ E0-P70 количество PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в единице площади клубочковой зоны существенно не изменялось по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовало значениям контрольной группы (рис. 41а, 42б). Экспрессия PRH/Nhex кортикостероцитами в пучковой и сетчатой зонах увеличилась, но была значительно меньше контрольных значений (рис. 41б,в, 42б,д). Аналогичные изменения наблюдались в мозговом веществе (рис. 41г, 43в).

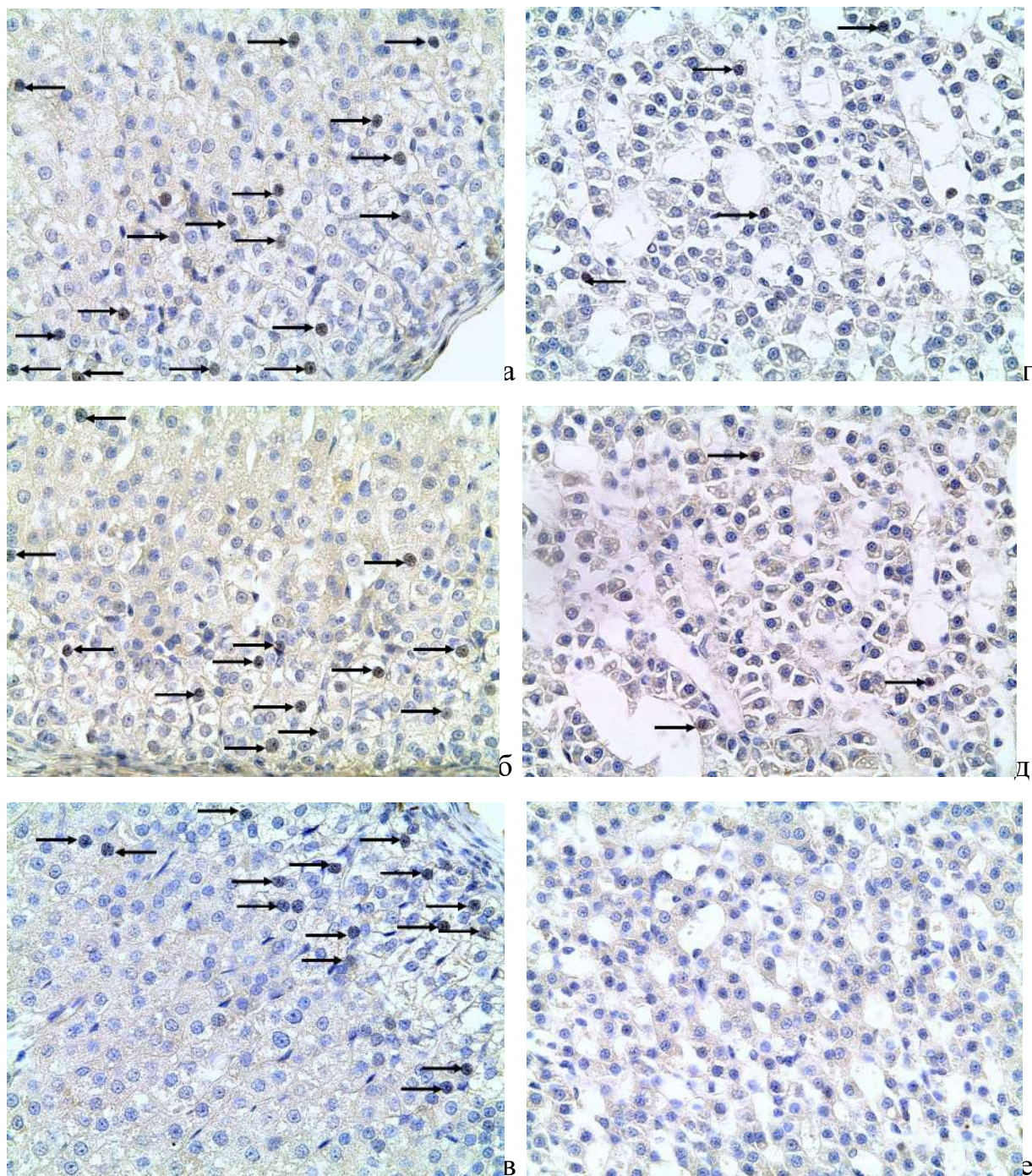


Рис. 42. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex кортикостероцитами клубочковой и пучковой зон (а) и сетчатой зоны (г) у крыс контрольной группы постпубертатного возраста, у крыс подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном (б, д) и только в постнатальном периодах онтогенеза (в, е, соответственно). Докраска гематоксилином. Ув. 400.

Примечания: PRH/Nhex-позитивные клетки указаны стрелками.

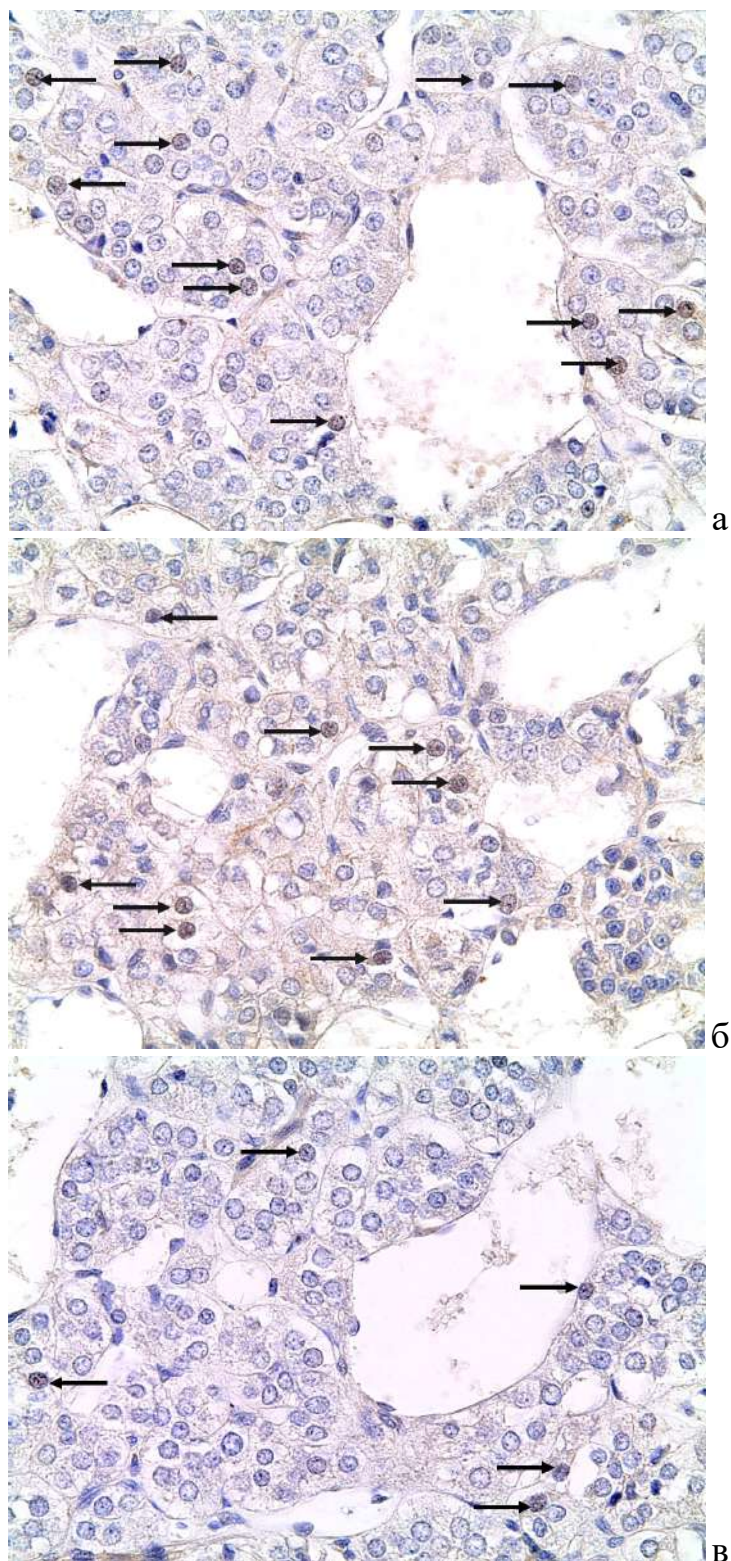


Рис. 43. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex хромаффинными клетками у крыс контрольной группы постпубертатного возраста (а), у крыс подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном (б) и только в постнатальном периодах онтогенеза (в). Докраска гематоксилином. Ув. 400.

Примечания: PRH/Nhex-позитивные клетки указаны стрелками.

У крыс группы ДДТ P0-P70 количество PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне не изменялось по сравнению с предыдущим сроком исследования и не отличалось от значений контрольной группы (рис. 41а, 42в). В пучковой зоне доля количество PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов увеличилась, но была меньше контрольных значений (рис. 41б, 42в). В сетчатой зоне PRH/Nhex -позитивные кортикостероциты не выявлялись (рис. 41в, 42е). В мозговом веществе процент количество PRH/Nhex-позитивных хромаффинных клеток уменьшился по сравнению с предыдущим сроком исследования и был наименьшим в исследуемых группах (рис. 41г, 43в).

Заключение. У крыс контрольной группы к моменту максимального развития надпочечника отмечалось значительное увеличение экспрессирующих транскрипционный фактор PRH/Nhex эндокриноцитов и в корковом и в мозговом веществе. У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ, выявлена отличная от контрольной, динамика количества PRH/Nhex-позитивных клеток, а у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном периодах, увеличение их числа было значительно менее выраженным. У крыс, потреблявших ДДТ только в постнатальном периоде, наблюдались наибольшие отличия в динамике экспрессии PRH/Nhex, заключающиеся в отсутствии PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в сетчатой зоне коркового вещества и в мозговом веществе.

3.2.5. Исследование пролиферативной активности эндокриноцитов коркового и мозгового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

В корковом веществе надпочечника крыс контрольной группы Ki-67-позитивные кортикостероциты выявлялись во всех структурно-функциональных зонах (рис. 44, 45, 46). Их численность была невелика. Наиболее часто они встречались в клубочковой зоне и в наружной части пучковой зоны (рис. 44а, 46а, б). В мозговом веществе хромаффинные клетки ха-

рактизовались наименьшей численностью Ki-67-позитивных клеток (рис.45а, 46г).

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 численность Ki-67-позитивных кортикостероцитов в клубочковой и пучковой зонах была повышена по сравнению с контрольными значениями (рис. 44б, 46а, б). В участках пучковой зоны с неупорядоченным расположением клеток также встречались Ki-67-позитивные клетки. В сетчатой зоне и мозговом веществе, напротив, отмечалось уменьшение данного показателя (рис. 45 б, д, 46в, г).

У крыс группы ДДТ Р0-Р42 численность Ki-67-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне была меньше контрольных значений и значений группы ДДТ Е0-Р42 (рис. 44в, 46а). В пучковой зоне процент Ki-67-позитивных кортикостероцитов незначительно превышал показатели контрольной группы, но был меньше, чем в группе ДДТ Е0-Р42 (рис. 46б). Аналогично предыдущей группе в участках дисконфлексии выявлялись Ki-67-позитивные клетки (рис. 44г). В сетчатой зоне и в мозговом веществе доля Ki-67-позитивных эндокриноцитов была наименьшей в сравниваемых группах (рис. 45в, е, 46в,г).

Заключение. На 42-ые сутки постнатального онтогенеза у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ, интенсивность пролиферативных процессов в надпочечнике отличалась от контрольных значений и также имела отличия в зависимости от этапа развития, когда началось воздействие дисраптора. У крыс, потреблявших ДДТ только в постнатальном развитии, отмечалось снижение пролиферации клеток как в корковом, так и в мозговом веществе. Пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ приводило к усилению пролиферативных процессов в клубочковой и пучковой зонах. Общей чертой было снижение числа делящихся клеток в сетчатой зоне и мозговом веществе.

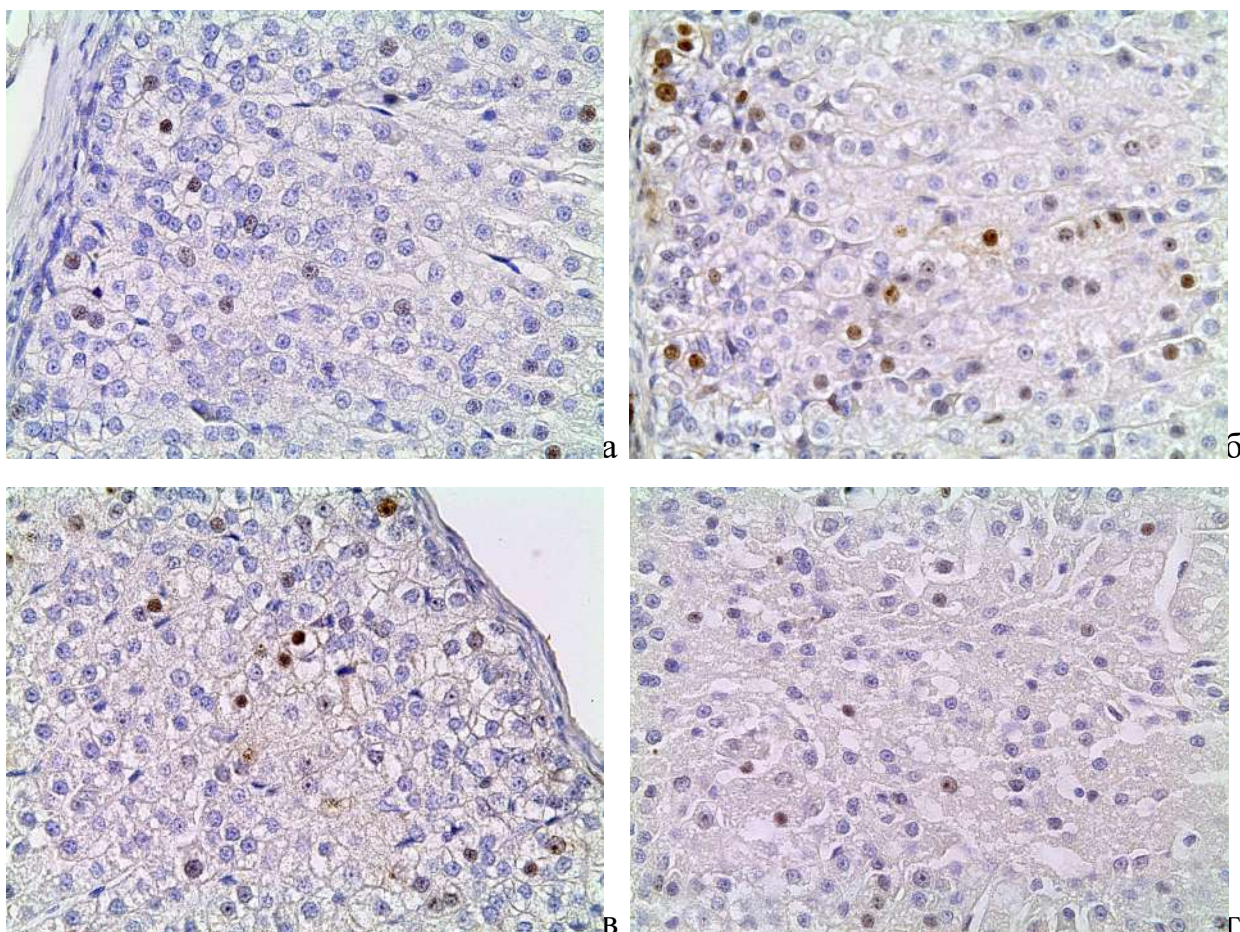


Рис. 44. Ki-67-позитивные кортикостероциты в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества в пубертатном периоде у крыс контрольной группы (а), группы ДДТ Е0-Р42 (б), группы ДДТ Р0-Р42 (в, г).

а – Ki-67-позитивные кортикостероциты расположены диффузно; б – увеличение числа Ki-67-позитивных кортикостероцитов в клубочковой и пучковой зонах, расположенных как диффузно, так и виде “цепочек”; в – небольшое число Ki-67-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне; г – Ki-67-позитивные клетки в участках дисконфлексации пучковой зоны.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

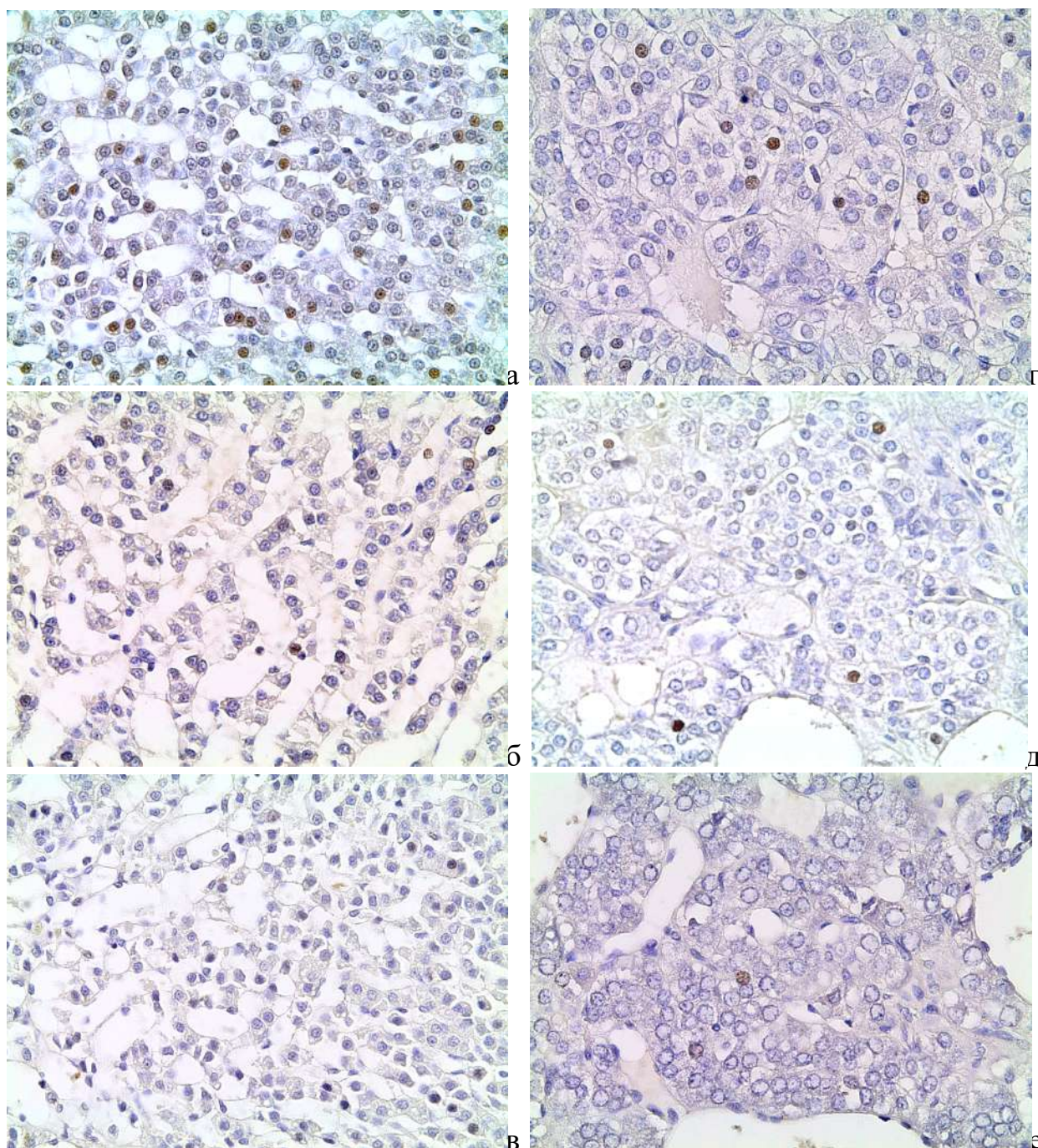


Рис. 45. Ki-67-позитивные кортикостероциты в сетчатой зоне коркового вещества и хромаффинных клеток в пубертатном периоде у крыс контрольной группы (а, г, соответственно), группы ДДТ E0-P42 (б, д), группы ДДТ P0-P42 (в, е).

б, в, д, е – меньшее число Ki-67-позитивных клеток как в сетчатой зоне, так и в мозговом веществе надпочечников у крыс опытных групп.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

а

б

в

г

Рис. 46. Изменения численности Ki-67-позитивных эндокриноцитов клубочковой (а), пучковой (б), сетчатой (в) зон и мозгового вещества (г) надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза ($M \pm m$)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – между опытными группами, # – от предыдущего срока исследования.

3.2.6. Исследование пролиферативной активности эндокриноцитов коркового и мозгового вещества надпочечников крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития отмечалось снижение численности Ki-67-позитивных кортикостероцитов (рис. 46 а, б, в, 47а, 48а). В мозговом веществе уменьшение данного показателя было менее выраженным (рис. 46г, 48г).

У крыс группы ДДТ Е0-Р70 по сравнению с предыдущим сроком исследования наблюдалось уменьшение числа Ki-67-позитивных кортикостероцитов в корковом веществе до контрольных значений (рис. 46 а, б, в, 47б, 48б) и увеличение в мозговом (рис. 46г, 48д). В инфильтратах, встречающихся в пучковой зоне, обнаруживалось большое количество Ki-67-позитивных лимфоцитов (рис. 47в).

У крыс группы ДДТ Р0-Р70 выявлено увеличение численности Ki-67-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне коркового вещества, вследствие чего ее значения превышали как контрольные, так и значения группы ДДТ Е0-Р70 (рис. 46а, 47г). В пучковой зоне процент Ki-67-позитивных кортикостероцитов уменьшился и не отличался от значений группы ДДТ Е0-Р70 и контрольной группы (рис. 46б). В сетчатой зоне выявлено уменьшение численности пролиферирующих клеток (рис. 48в). Процент Ki-67-позитивных кортикостероцитов был меньше, чем в группе ДДТ Е0-Р70 и соответствовал контрольным значениям (рис. 46в). В мозговом веществе обнаружено увеличение доли Ki-67-позитивных хромаффинных клеток (рис. 48е). Таким образом, их количество значительно превышало и контрольные значения, и значения группы ДДТ Е0-Р70 (рис. 46г).

Заключение. Достижение максимального развития органа сопровождалось в норме снижением пролиферативной активности клеток, особенно в корковом веществе. У животных, развивающихся в условиях воздействия дисрап-

тора, выявлено противоположное изменение динамики пролиферации хромафинных клеток. Также отмечались различия между группами опытных животных. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с момента рождения, пролиферативные процессы в клубочковой зоне нарастали, а в сетчатой не имели существенных возрастных изменений.

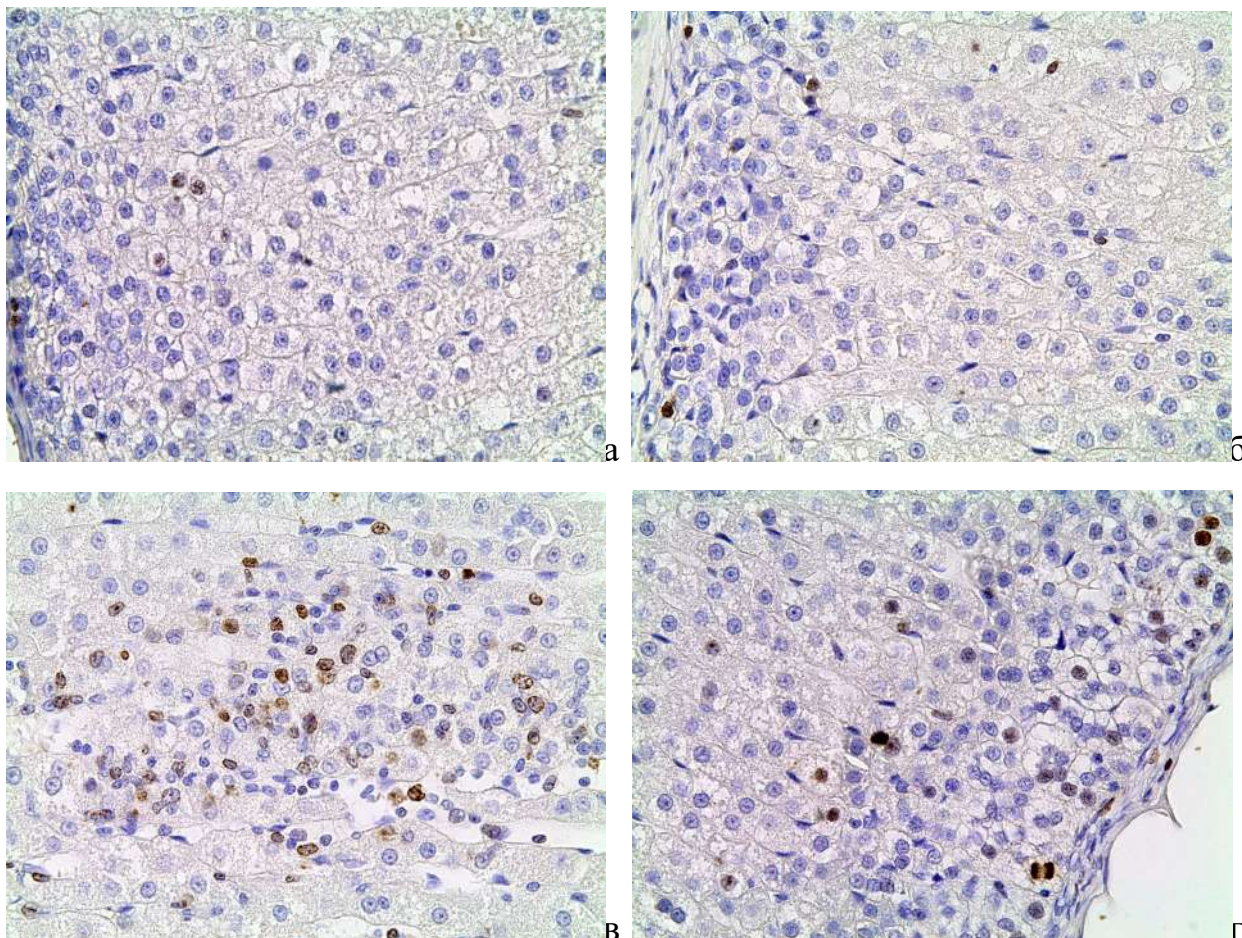


Рис. 47. Ki-67-позитивные кортикостероциты в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества в постпубертатном периоде у крыс контрольной группы (а), группы ДДТ Е0-Р70 (б, в), группы ДДТ Р0-Р70 (г).

а, б – небольшое число Ki-67-позитивных кортикостероцитов; в – очаг инфильтрации пучковой зоны с большим содержанием различных видов Ki-67-позитивных клеток; г – большее содержание Ki-67-позитивных кортикостероцитов по сравнению с контролем.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

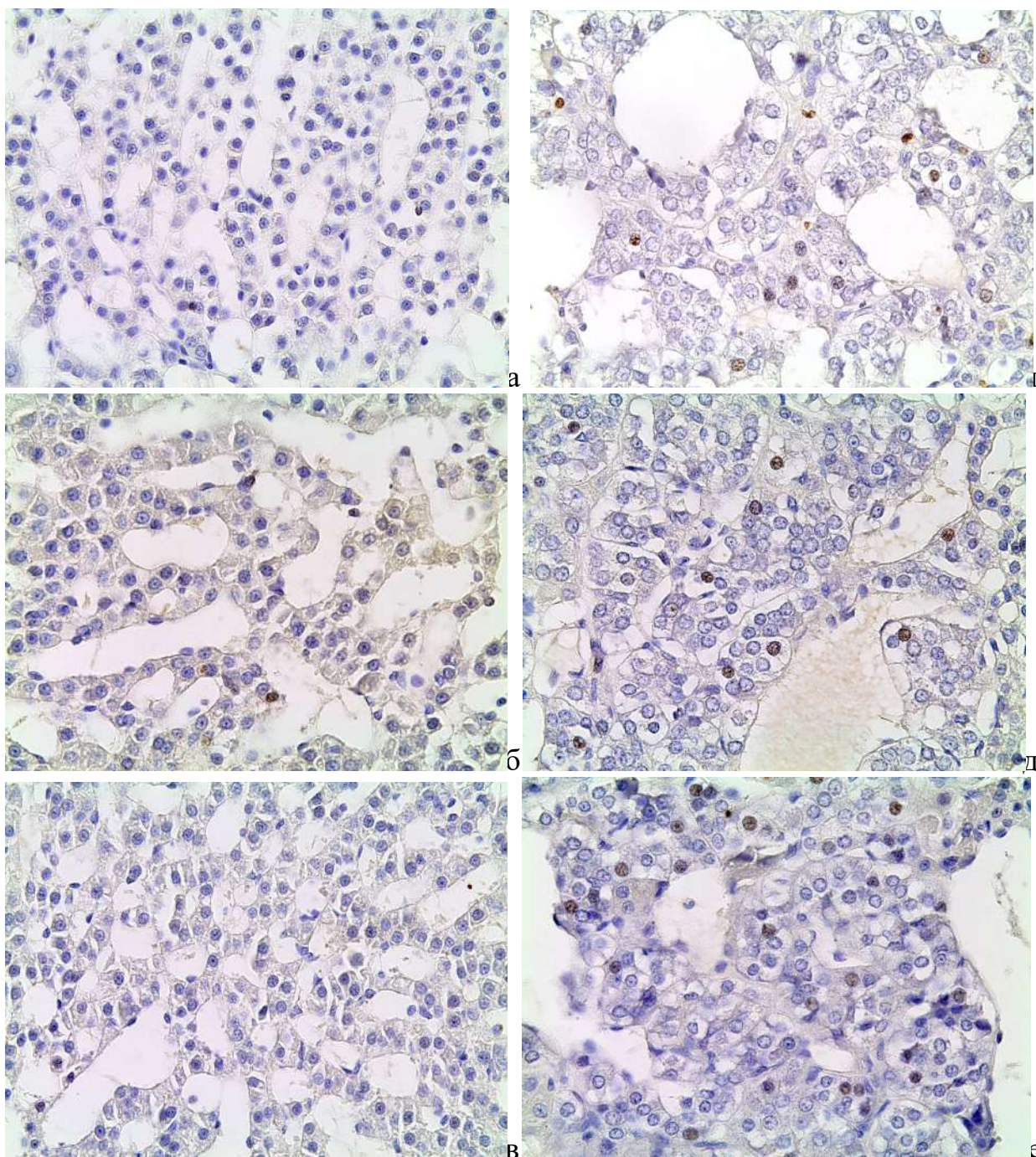


Рис. 48. Ki-67-позитивные кортикостероциты в сетчатой зоне коркового вещества и хромаффинных клеток в постпубертатном периоде у крыс контрольной группы (а, г, соответственно), группы ДДТ E0-P70 (б, д), группы ДДТ P0-P70 (в, е).

а б, в – низкая численность Ki-67-позитивных клеток в сетчатой зоне;

д, е – увеличение числа Ki-67-позитивных хромаффинных клеток по сравнению с контролем.

Докраска гематоксилином Майера. Ув. 400.

3.2.7. Роль транскрипционного фактора PRH/Nhex и канонического Wnt/ β -катенин сигналинга в регуляции процессов пролиферации эндокриноцитов надпочечника

У животных контрольной группы к 70-ым суткам постнатального онтогенеза отмечалось снижение пролиферативной активности эндокриноцитов коркового и мозгового вещества по сравнению с 42-ыми сутками.

В клубочковой зоне уменьшение процессов пролиферации происходило на фоне усиления экспрессии PRH/Nhex без изменения активности канонического Wnt-сигналинга. В пучковой зоне также уменьшение численности кортикостероцитов, находящихся в разных фазах митотического цикла, сопровождалось активацией PRH/Nhex без выраженного изменения параметров канонического Wnt/ β -катенин сигналинга. В сетчатой зоне наблюдалась аналогичная зависимость, так как на 42-ые сутки, когда сетчатая зона крыс функционирует очень активно, транскрипционный фактор PRH/Nhex в кортикостероцитах не обнаруживался. Анализ ассоциации выявил наличие высокой и средней степени обратной зависимости между численностью Ki-67-позитивных и PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в различных зонах коркового вещества (табл. 5). Таким образом, усиление экспрессии транскрипционного фактора Nhex в кортикостероцитах коркового вещества сопровождалось снижением их пролиферативной активности.

В мозговом веществе также с возрастом отмечалось уменьшение числа митотически делящихся клеток, что сопровождалось значительным усилением экспрессии Nhex, а также активацией канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, в отличие от коркового вещества. Результаты корреляционного анализа показывают наличие более слабой отрицательной зависимости между числом Ki-67-позитивных и PRH/Nhex-позитивных эндокриноцитов по сравнению с корковым веществом и одновременно наличие сильной прямой зависимости между показателями активации канонического Wnt-сигналинга и экспрессии PRH/Nhex в хромаффинных клетках (табл. 5, 6). То есть активация сигнального

каскада, стимулирующего пролиферацию, сопровождалась усилением экспрессии транскрипционного фактора, подавляющего пролиферативные процессы. Эти данные также указывают на антипролиферативную функцию PRH/Nhex в отношении хромаффинных клеток и его кооперацию с каноническим Wnt-сигналингом в постнатальном морфогенезе мозгового вещества.

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 повышение пролиферации кортикостероцитов клубочковой зоны по сравнению с контролем происходило при усилении экспрессии PRH/Nhex (табл. 5) и подавлении канонического Wnt/ β -катенин сигналинга. Однако снижение числа делящихся клеток к 70-ым суткам происходило при практически неизменном уровне продукции PRH/Nhex без существенных изменений канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, что указывает на активацию эндокринным дисраптором других антипролиферативных факторов.

Табл. 5.

Результаты анализа ассоциации численности Ki-67-позитивных и PRH/Nhex-позитивных эндокриноцитов надпочечников крыс контрольных групп и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ, в течение всего эксперимента

Структура Группа	Клубочковая зона	Пучковая зона	Сетчатая зона	Мозговое вещество
Контрольная	R= - 0,97 p= 0,000002	R= -0,80 p= 0,0054	R= - 0,74 p=0,009	R= - 0,45 p= 0,04
Пре- и постнатальное воздействие ДДТ	R= - 0,80 p= 0,00038	R= 0,50 p= 0,11	R= - 0,65 p= 0,025	R= 0,50 p= 0,11
Постнатальное воз- действие ДДТ	R= - 0,80 p= 0,0077	R= -0,80 p= 0,0077	—	R= - 0,76 p= 0,009

Табл. 6.

Результаты анализа ассоциации показателей активации канонического Wnt/ β -катенин сигналинга и экспрессии PRH/Nhex в хромаффинных клетках надпочечников крыс контрольных групп и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ, в течение всего эксперимента

Показатель	Группа	Контрольная	Пре- и постнатальное воздействие ДДТ	Постнатальное воздействие ДДТ
Коэффициент корреляции и уровень статистической значимости		R= 0,99 p= 0,000001	R= 0,40 p= 0,045	R= 0,70 p= 0,01

У крыс группы ДДТ P0-P70 напротив, с возрастом отмечалась активация пролиферативных процессов в клубочковой зоне, что сопровождалось подавлением как канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, так и экспрессии PRH/Nhex. Таким образом, в данной группе также наблюдалась обратная зависимость между экспрессией PRH/Nhex и количеством Ki-67-позитивных кортикостероцитов (табл. 5).

В пучковой зоне коркового вещества у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки происходило небольшое увеличение пролиферативной активности кортикостероцитов на фоне усиления экспрессии PRH/Nhex и одновременного подавления канонического Wnt/ β -катенин сигналинга также, как и в клубочковой зоне, что свидетельствует о дисрапторном действии ДДТ. На 70-ые сутки количество митотически делящихся клеток не отличалось от значений контрольной группы, что сопровождалось подавлением канонического Wnt-сигналинга и значительно более низким уровнем экспрессии PRH/Nhex. Но, тем не менее, снижение интенсивности

пролиферативных процессов по мере развития органа у крыс группы ДДТ Е0-Р70 происходило на фоне супрессии канонического Wnt/ β -катенин сигналинга и активации PRH/Nhex, что также указывает на ингибирование пролиферации транскрипционным фактором PRH/Nhex, а отсутствие обратной зависимости между этими показателями (табл. 5) указывает на механизм действия дисраптора.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии, на 42-ые сутки увеличение экспрессии Nhex на фоне подавления канонического Wnt/ β -катенин сигналинга не сопровождалось изменением пролиферативной активности кортикостероцитов пучковой зоны. На 70-ые сутки очень низкая экспрессия Nhex и значительная супрессия канонического Wnt/ β -катенин сигналинга по сравнению с контролем не вызывала изменений показателя пролиферативной активности, что подчеркивает совместную роль этих факторов в регуляции развития пучковой зоны надпочечника. Снижение интенсивности пролиферации с возрастом также, как и в контрольной группе и группе ДДТ Е0-Р70 сопровождалось увеличением экспрессии PRH/Nhex (табл. 5), чему также способствовало подавление канонического Wnt/ β -катенин сигналинга как в группе ДДТ Е0-Р70.

В сетчатой зоне коркового вещества у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки, как и в контрольной группе не выявлено экспрессии PRH/Nhex, но наблюдалось ингибирование канонического Wnt, что сопровождалось пониженной пролиферативной активностью кортикостероцитов по сравнению с контролем. На 70-ые сутки выявлена экспрессия PRH/Nhex при сохранении супрессии канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, а также увеличение пролиферативной активности клеток. Как и у контрольных животных, с возрастом наблюдалось снижение пролиферативной активности кортикостероцитов сетчатой зоны и усиление экспрессии PRH/Nhex, но эта зависимость была менее выражена (табл. 5).

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии, не выявлено активации PRH/Nhex ни на 42-ые, ни на 70-ые сутки. Ин-

гибирование канонического Wnt/ β -катенин сигналинга сопровождалось снижением пролиферации кортикостероцитов с возрастом.

На 42-ые сутки постнатального развития у животных, подвергавшихся воздействию ДДТ, уменьшение процента Ki-67-позитивных хромаффинных клеток совпадало с ростом числа экспрессирующих Nhex клеток. При этом у крыс группы ДДТ E0-P42 отмечалось подавление Wnt-сигналинга. На 70-ые сутки, несмотря на подавление канонического Wnt, отмечался рост пролиферативной активности хромаффинных клеток в сочетании со снижением Nhex по сравнению с контролем. Эти данные указывают на антипролиферативное действие Nhex. Отсутствие корреляции между экспрессией PRH/Nhex и активностью канонического Wnt (табл. 6) указывает то, что подавление Wnt и нарушение регуляции пролиферации хромаффинных клеток – один из возможных механизмов дисрапторного действия ДДТ в пренатальном периоде. Возрастная динамика экспрессии PRH/Nhex в опытных группах значительно отличалась от контрольной. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пре- и постнатальном периодах развития, не наблюдалось динамики в экспрессии PRH/Nhex, но пролиферативная активность клеток увеличивалась, что было связано с ингибированием канонического Wnt-сигналинга. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в постнатальном периоде, в отличие от контроля происходило уменьшение экспрессии PRH/Nhex с возрастом, что сопровождалось повышением пролиферативной активности хромаффинных клеток, как и в предыдущей опытной группе. Таким образом, наблюдалась обратная зависимость между показателями пролиферации и экспрессии PRH/Nhex (табл. 5). При этом параметры активации канонического Wnt/ β -катенин сигналинга не изменялись, то есть взаимосвязь активации Wnt и PRH/Nhex была слабее (табл. 6).

Заключение. Выявлена зависимость между снижением пролиферативной активности кортикостероцитов и повышением экспрессии ими PRH/Nhex без существенного изменения канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, а также выраженная кооперация и антагонистическое влияние канонического

Wnt/ β -катенин сигналинга и транскрипционного фактора PRH/Hhex на пролиферативную активность хромаффинных клеток у контрольных животных. У животных опытных групп наблюдалось нарушение выявленной зависимости, особенно в корковом веществе у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном развитии.

3.3. ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КОРТИКОСТЕРОЦИТОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ И ТОЛЬКО В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

3.3.1. Изменения продукции гормонов коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном развитии (группа ДДТ Е0-Р42) в пубертатном периоде выявлены статистически значимые снижение концентрации альдостерона, эстрадиола, эстрогена и повышение концентрации кортикостерона, прогестерона и 17-оксипрогестерона в сыворотке крови (табл. 7).

У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора только в постнатальном развитии (группа ДДТ Р0-Р42) в пубертатном периоде выявлены статистически значимые повышение концентрации альдостерона, эстрадиола, эстрогена, а также снижение концентрации кортикостерона и прогестерона в сыворотке крови (табл. 7). Концентрации стероидных гормонов в системном кровотоке у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы развития существенно отличались по всем исследуемым параметрам (табл. 7).

Табл. 7.

Изменения концентраций стероидных гормонов у крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном, а также только в постнатальном периодах онтогенеза ($M \pm m$)

Показатель \ Группа	Контрольная	ДДТ Е0-Р42	ДДТ Р0-Р42
Альдостерон, пг/мл	138,59±12,11	41,50±2,02	202,57±18,27*♦
Кортикостерон, нг/мл	376,40±22,32	520,39±32,64*	176,95±18,97*♦
Эстрадиол, пг/мл	12,99±1,42	Не обнаружился	16,21±1,68*♦
Эстрон, пг/мл	88,97±5,65	49,65±3,86*	114,67±5,35*♦
Прогестерон, нг/мл	12,70±0,53	15,87±0,10*	6,05±0,22*♦
17-оксипрогестерон, нг/мл	0,05±0,004	0,1±0,008*	0,06±0,005♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ Р0-Р42 от группы ДДТ Е0-Р42.

Заключение. Воздействие эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии приводило к изменениям продукции стероидных гормонов в пубертатном периоде, диаметрально противоположных таковым у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии. Общей чертой у этих групп были реципрокные соотношения между концентрацией глюкокортикоидов и минералокортикоидов.

3.3.2. Изменения ультраструктуры кортикостероцитов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы пубертатного возраста

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов клубочковой зоны

Кортикостероциты клубочковой зоны крыс контрольной группы имели продолговатую форму, эксцентрически расположенное ядро округлой или овальной формы с преобладанием эухроматина в структуре и эктопией ядрышка (рис. 49). Митохондрии округлой или овальной формы имели пластинчатые кристы и гомогенный средней электронной плотности матрикс. У многих митохондрий наблюдался отек матрикса разной степени выраженности. В некоторых клетках был хорошо выражен комплекс Гольджи. Его цистерны имели содержимое низкой электронной плотности. Лизосомы небольшого размера встречались редко. ЭПС была представлена мелкими пузырьками. Липидные капли небольшого размера с содержимым умеренной электронной плотности контактировали с митохондриями, но встречались не во всех клетках. Микроворсинки на плазмолемме были слабо развиты.

Кортикостероциты клубочковой зоны крыс группы ДДТ E0-P42 имели типичную форму, но были уменьшены в размерах по сравнению с контролем (табл. 8). Их ядра имели округлую или вытянутую форму. Размер ядер не отличался от контрольных значений (табл. 8). Содержание эухроматина было высоким, ядрышко располагалось, как правило, центрально. В ядрах часто выявлялось расширение перинуклеарного пространства (рис. 50). Митохондрии по структуре не отличались от таковой контрольной группы (табл. 8). Отличием было уменьшение их числа и доли митохондрий с отеком матрикса (табл. 8). Вторым отличием было очень высокое содержание липидных включений в цитоплазме (табл. 8). Включения липидов были представлены множественными

липидными каплями небольшого диаметра повышенной электронной плотности, занимавшими до половины объема цитоплазмы (рис. 51). Комплекс Гольджи и ЭПС были умеренно выражены. Лизосомы встречались редко. В цитоплазме наблюдались группы свободных рибосом, а также хорошо развитая гЭПС (рис. 50, 52). На плазматической мембране в области контакта с перикапиллярным пространством микроворсинки были слабо развиты (рис. 52). Просветы капилляров, как правило, были заполнены эритроцитами (рис. 52).

Кортикостероциты клубочковой зоны крыс группы ДДТ Р0-Р42 по форме и размерам соответствовали значениям контрольной группы (табл. 8). Ядра располагались эксцентрично. Они характеризовались высоким содержанием эухроматина, центрально расположенным ядрышком и расширением перинуклеарного пространства. Митохондрии округлой и овальной формы не отличались по размеру от контрольных значений (табл. 8). Некоторые из них имели как пластинчатые, так и везикулярные, и тубулярные кристы (рис. 53). Число митохондрий в мм^2 цитоплазмы было увеличено (табл. 8). ЭПС была более выражена, чем у крыс контрольной группы. Ее каналы были расширены и заполнены содержимым низкой электронной плотности (рис. 53). Лизосомы встречались не во всех клетках. Содержание липидных включений в цитоплазме было значительно меньшим, чем в контрольной группе и группе ДДТ Е0-Р42 (табл. 8). Липидные капли, как и в контроле, имели среднюю электронную плотность, но отличались очень небольшими размерами. На плазматической мембране были хорошо развиты микроворсинки.

Табл. 8.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P42) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в пубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели	Группы	ДДТ	
	Контрольная P42	E0-P42	P0-P42
Площадь кортикостероцита, мкм^2	94,67 $\pm$ 2,99	78,67 $\pm$ 0,95*	90,16 $\pm$ 2,40♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	26,72 $\pm$ 0,56	27,13 $\pm$ 0,51	27,30 $\pm$ 0,35
Диаметр митохондрий, мкм	0,99 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,03
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	0,36 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,03*♦
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	44,59 $\pm$ 3,34	7,50 $\pm$ 0,75*	68,33 $\pm$ 2,08*♦
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	10,14 $\pm$ 0,28	46,53 $\pm$ 4,05*	0,72 $\pm$ 0,04♦
Диаметр липидных включений, мкм	1,14 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,08*♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

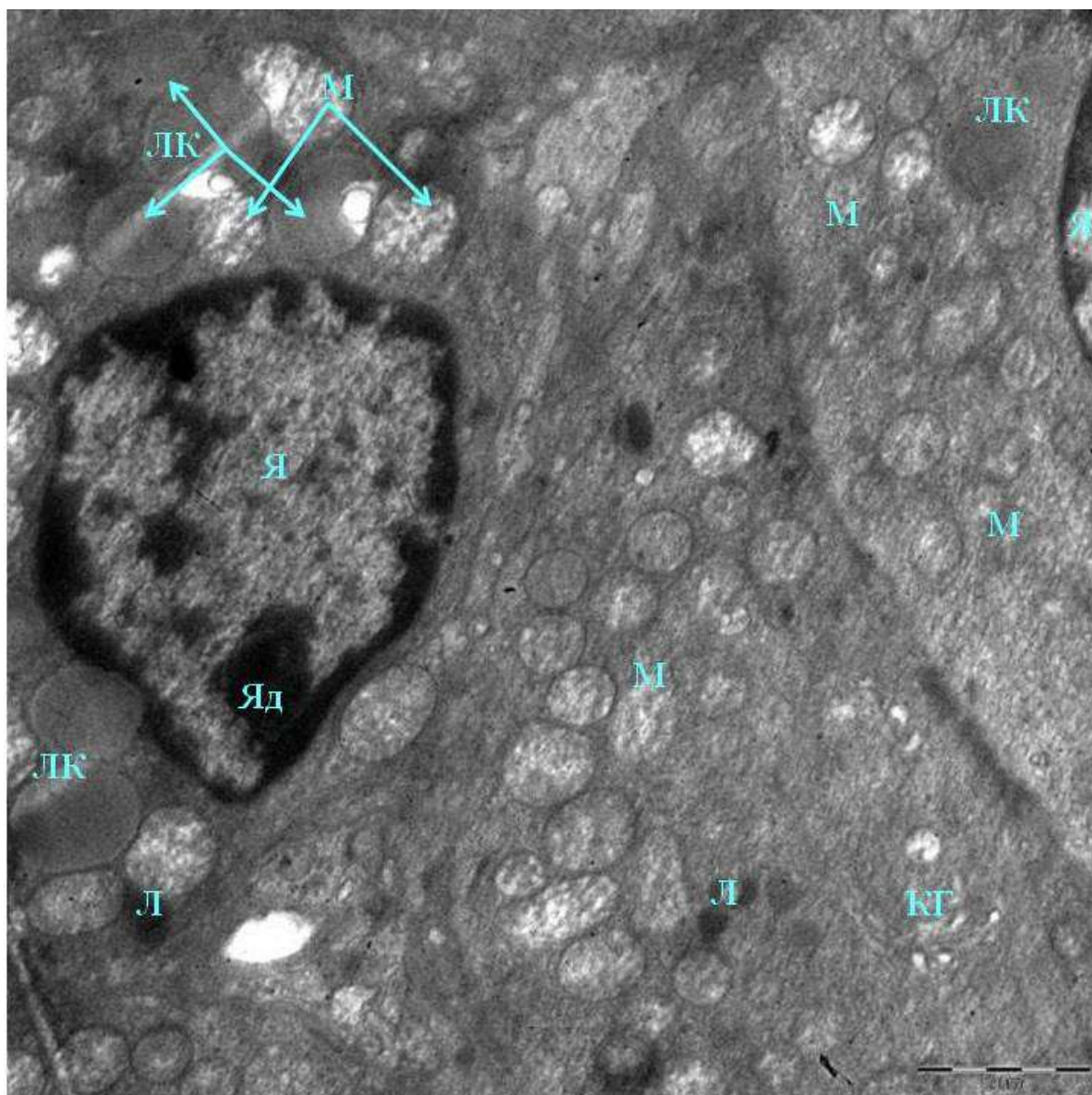


Рис. 49. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Ядро (Я) с эктопией ядрышка (Яд). Содержание липидных капель (ЛК) небольшое, липидные капли контактируют с митохондриями (М). У многих митохондрий отек матрикса. В цитоплазме располагается комплекс Гольджи (КГ) с просветлением содержимого цистерн. Встречаются единичные лизосомы (Л).

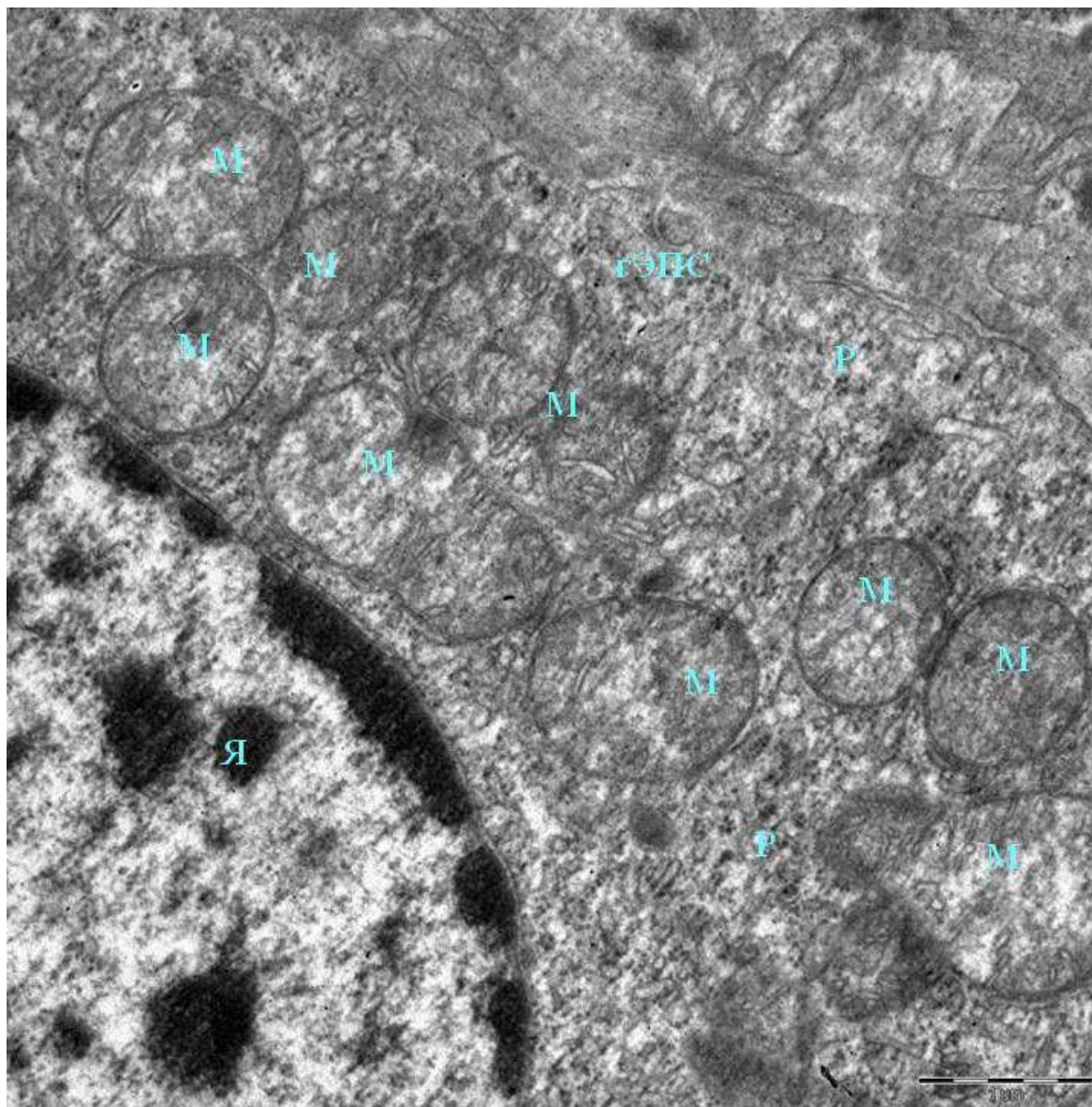


Рис. 50. Ультраструктура кортикостероцита клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42). В ядре (Я) преобладает эухроматин, перинуклеарное пространство расширено, во многих митохондриях отек (М) матрикса, в цитоплазме хорошо выражена гЭПС и свободно лежащие рибосомы (Р).

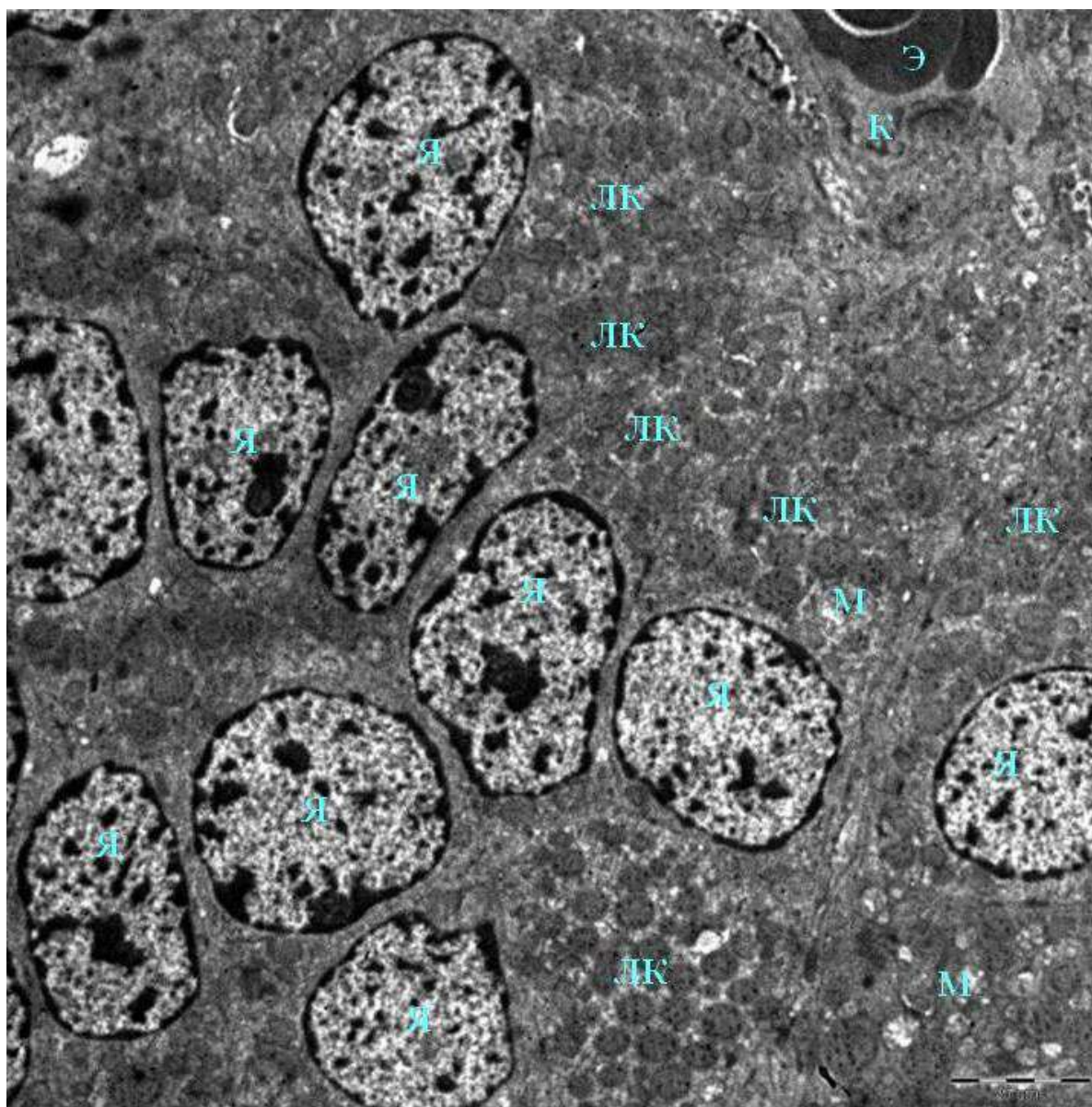


Рис. 51. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42).

Участок клубочка и капилляр (К), заполненный эритроцитами (Э). Значительное увеличение содержания липидов в клетках.

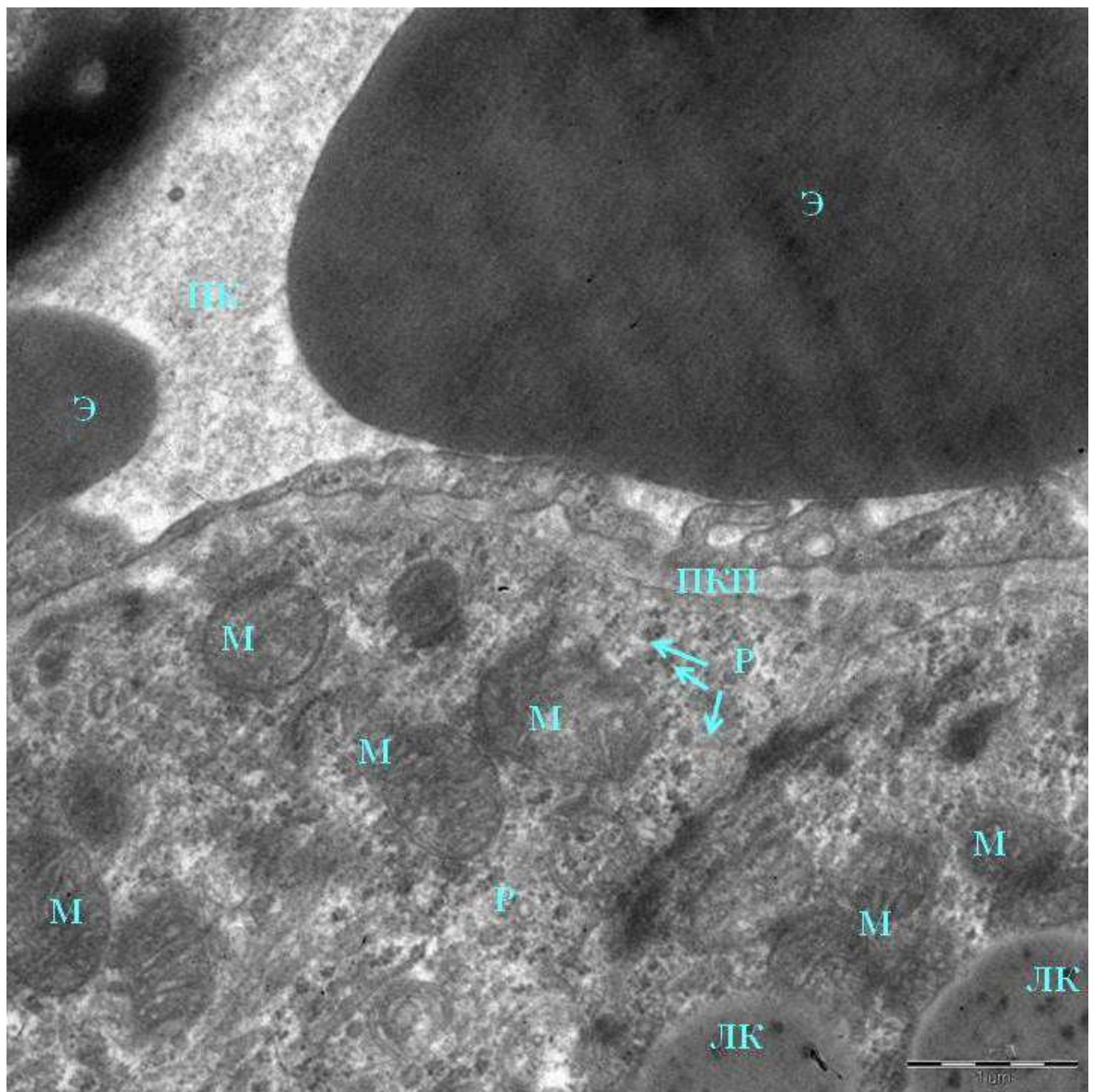


Рис. 52. Ультраструктура кортикостероцита и капилляра клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

В цитоплазме кортикостероцитов располагаются митохондрии (М) с ламеллярными кристами, свободные рибосомы (Р, указаны стрелками), липидные капли (ЛК). На плазматической мембране, граничащей с перикапиллярным пространством (ПКП) микроворсинки отсутствуют. В просвете капилляра (ПК) находятся эритроциты (Э).

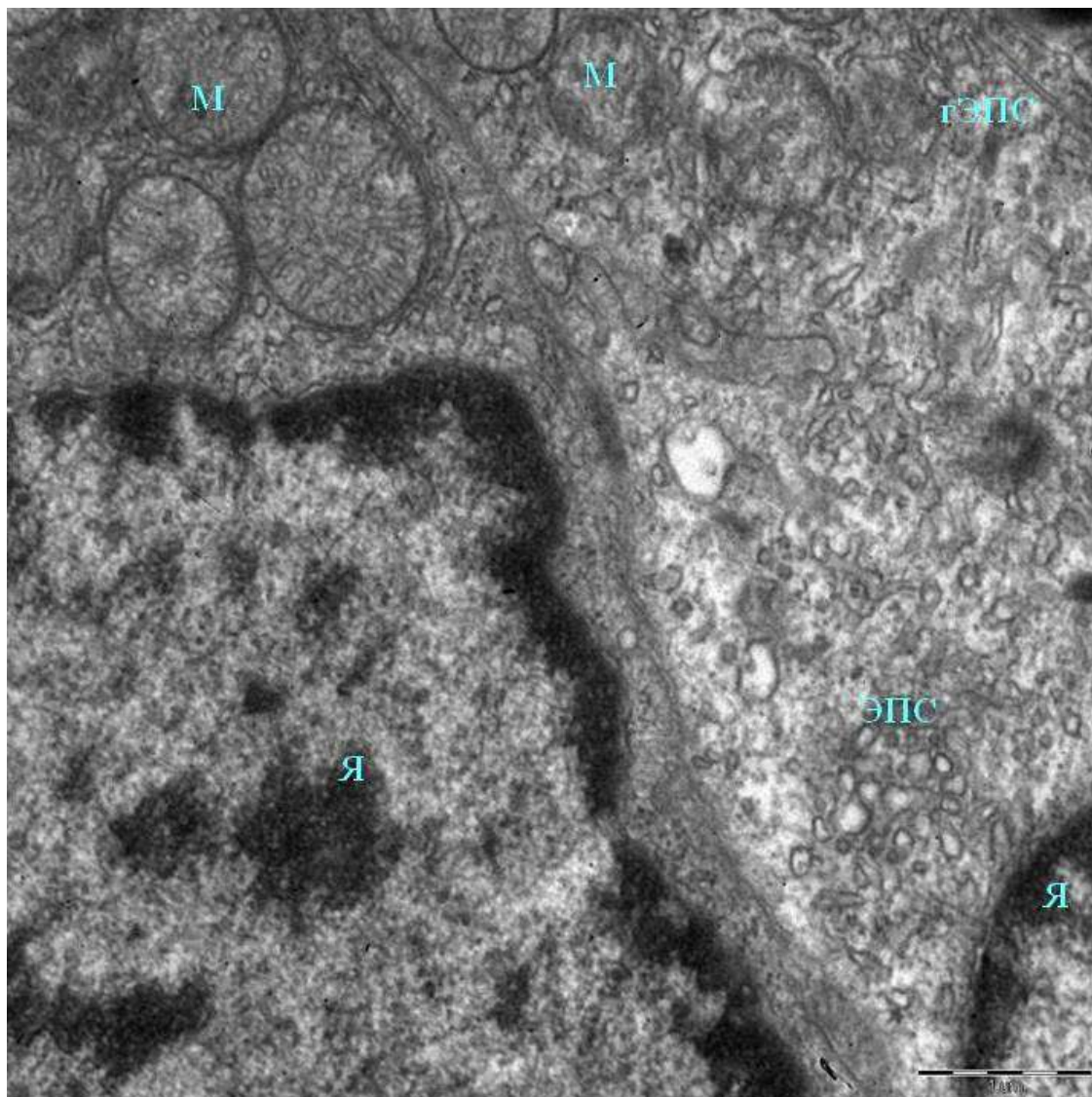


Рис. 53. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки (ДДТ Р0-Р42).

В клетке слева ядро (Я) имеет неровный контур, митохондрии (М) с пластинчатыми и везикулярными кристами и плотным матриксом. В клетке справа расширение канальцев ЭПС. Содержимое канальцев имеет низкую электронную плотность.

Заключение. У крыс группы ДДТ Е0-Р42 в пубертатном периоде кортикостероциты клубочковой зоны были уменьшены в размерах, их ультраструктура отличалась накоплением липидов в цитоплазме и меньшей функциональной нагрузкой на митохондрии, что свидетельствует о пониженной секреторной

деятельности. У крыс группы ДДТ Р0-Р42, напротив, выявлены признаки повышенной функциональной активности клеток.

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов пучковой зоны

Кортикостероциты пучковой зоны надпочечника крыс контрольной группы формировали тяжи, вдоль которых располагались капилляры, заполненные плазмой. Плазматические мембраны клеток на границе с перикапиллярным пространством имели на поверхности микроворсинки. Ядра в клетках располагались преимущественно центрально. Ядра имели круглую либо овальную форму. В некоторых клетках ядра имели инвагинации. В структуре ядра преобладал эухроматин (рис. 54). Ядрышко располагалось центрально либо ближе к ядерной оболочке. Цитоплазма имела гомогенную структуру средней электронной плотности. В ней располагались множественные митохондрии, имеющие округлую или овальную форму. Преимущественно встречались митохондрии с везикулярными кристами (рис. 54). В среднем у 50% митохондрий отмечался отек матрикса (табл. 9, рис. 55). ЭПС и комплекс Гольджи были слабо развиты. Лизосомы встречались крайне редко. Содержание липидных включений в цитоплазме было невелико (табл. 9). В клетках встречались единичные липидные капли средней и высокой электронной плотности, редко контактирующие с митохондриями (рис. 55).

Кортикостероциты пучковой зоны крыс группы ДДТ Е0-Р42 имели меньшие размеры по сравнению с контролем (табл. 9). Наряду с клетками, имеющими типичную структуру, встречались как единичные, так и тяжи клеток с ядрами меньшего размера с неровным контуром, многочисленными крупными митохондриями с резко просветленным матриксом и цитоплазмой высокой электронной плотности (рис. 56). На границе клубочковой и пучковой зон встречались очаги кровоизлияний (рис. 57). В этих участках в кортикостероцитах отмечалось очень высокое содержание митохондрий с отеком матрикса и деструкцией крист. Некоторые кортикостероциты характеризовались

очень высокой электронной плотностью цитоплазмы, ядром с неровными контурами и более компактным строением хроматина.

Табл. 9.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P42) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в пубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P42	E0-P42	P0-P42
Площадь кортикостероцита, мкм^2	121,98 $\pm$ 2,14	106,33 $\pm$ 2,90*	114,70 $\pm$ 2,67*
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	29,51 $\pm$ 0,49	27,76 $\pm$ 0,24*	28,63 $\pm$ 0,50
Диаметр митохондрий, мкм	1,11 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,05*	1,35 $\pm$ 0,03*
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	0,36 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,04*	0,35 $\pm$ 0,05
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	53,62 $\pm$ 3,34	63,90 $\pm$ 5,75	78,58 $\pm$ 5,79*
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	8,33 $\pm$ 0,26	10,96 $\pm$ 1,05	9,89 $\pm$ 0,86
Диаметр липидных включений, мкм	1,14 $\pm$ 0,08	1,80 $\pm$ 0,09*	2,50 $\pm$ 0,18*♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

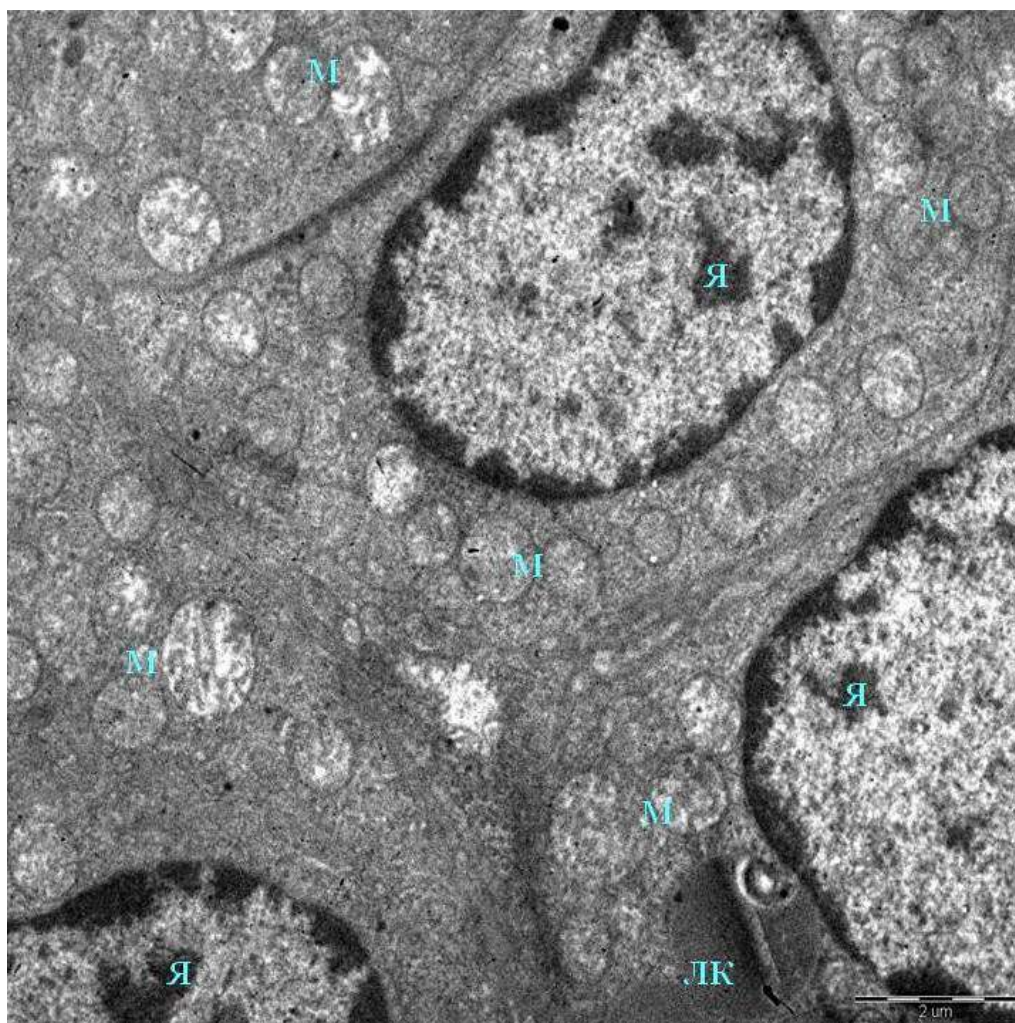


Рис. 54. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Клетки содержат крупные овальные ядра (Я) с преобладанием эухроматина над гетерохроматином. Митохондрии (М) округлой формы различного размера содержат везикулярные кристы. У многих митохондрий матрикс просветлен. В цитоплазме мало липидных капель (ЛК).

В наружных участках пучковой зоны также встречались участки дисконкомплексации, представленные скоплением клеток с ядрами с неровными очертаниями и преобладанием эухроматина. Их особенностью была слабая выраженность наружных клеточных мембран, вследствие чего они представляли гетерогенную структуру, состоящую из ядер, небольших округлых митохондрий с просветленным матриксом и липидных капель высокой электронной плотно-

сти, расположенных в рыхлой средней электронной плотности цитоплазме, и капилляров с истонченными стенками, просвет которых был обтурирован эритроцитами (рис. 58). В более глубоких слоях пучковой зоны во многих клетках отмечалось расширение перинуклеарного пространства, расширение канальцев ЭПС и гЭПС особенно в парануклеарной области, гипертрофия комплекса Гольджи (рис. 59). Содержание липидных включений в таких клетках было невысоким.

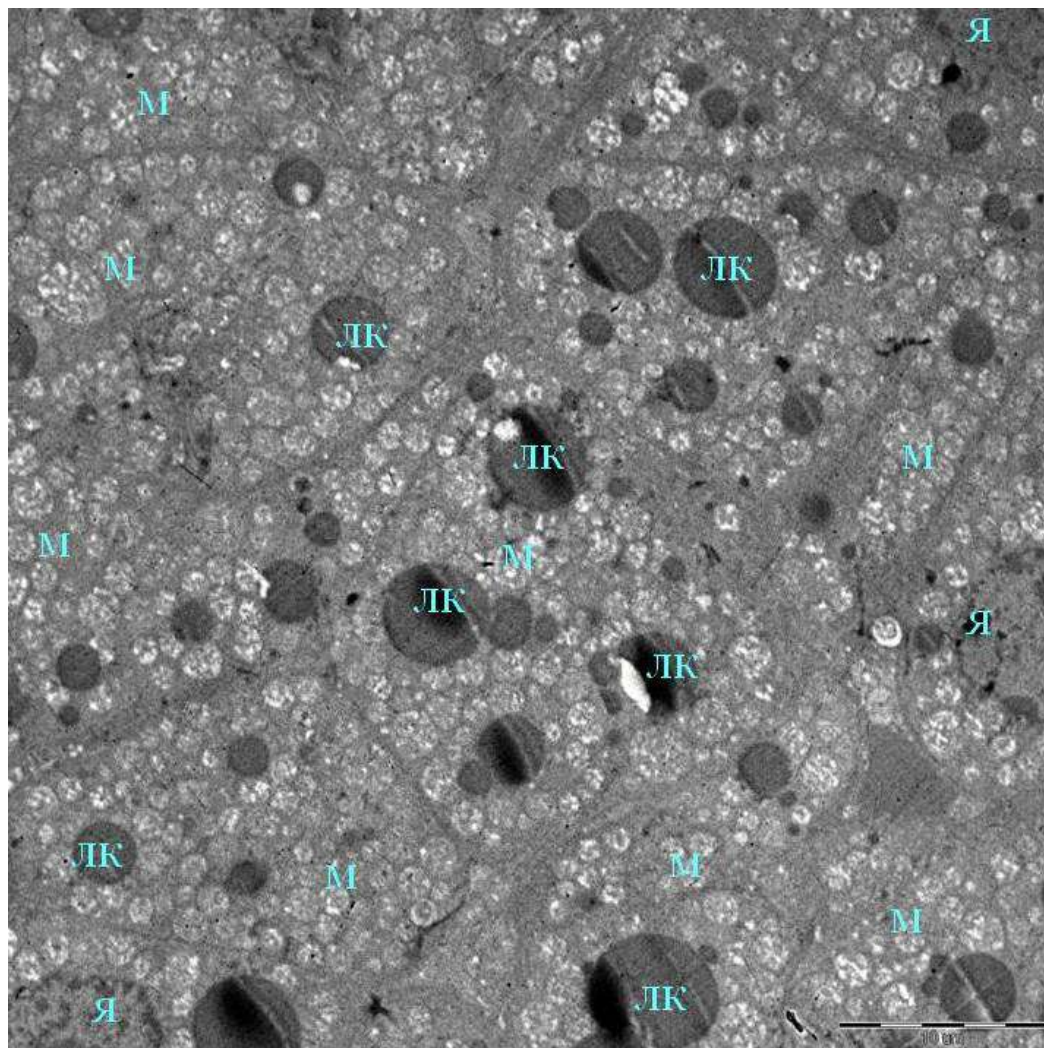


Рис. 55. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Клетки содержат большое количество митохондрий (М) с отеком матрикса и крупные липидные капли (ЛК) высокой электронной плотности.

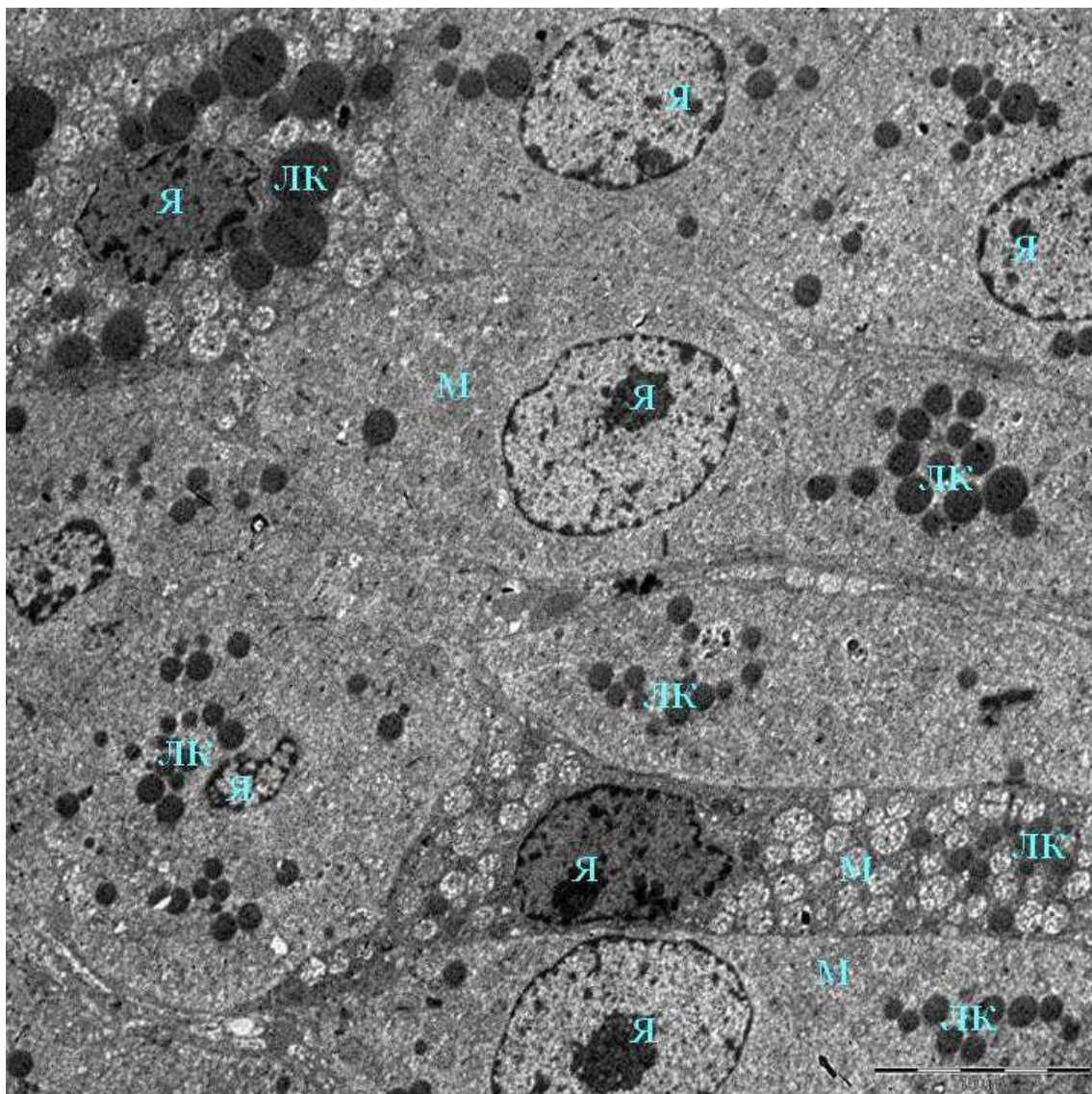


Рис. 56. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42).

Наряду с кортикостероцитами с крупными овальными ядрами (Я) с ровным контуром, митохондриями (М) с матриксом средней электронной плотности и различным содержанием липидных капель (ЛК) присутствуют уменьшенные в размерах кортикостероциты с меньшими по размерам ядрами с неровными контурами, более плотной структурой гетерохроматина, у которых практически вся цитоплазма занята крупными митохондриями с резким отеком матрикса. Содержание липидных капель в них варьирует. Цитоплазма имеет повышенную электронную плотность.

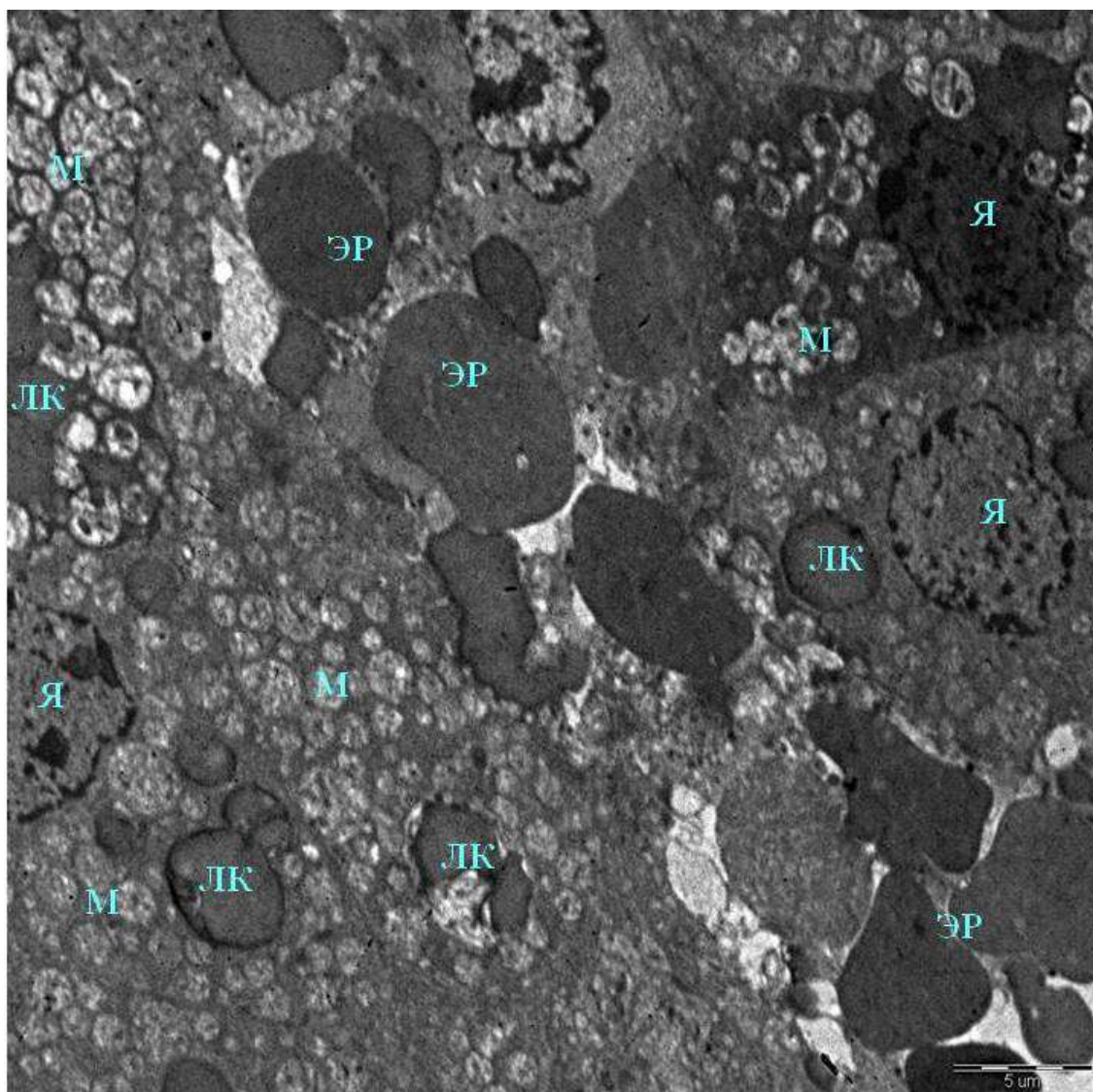


Рис. 57. Ультраструктура кортикостероцитов в наружной части пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

Участок кровоизлияния в пучковой зоне. Расширение капилляра и разрушение его стенки. Просвет капилляра заполнен эритроцитами (ЭР) и клеточным детритом. Кортикостероциты содержат небольшое количество липидных капель (ЛК). Выражен отек матрикса митохондрий (М). В некоторых кортикостероцитах цитоплазма и ядро (Я) имеют высокую электронную плотность.

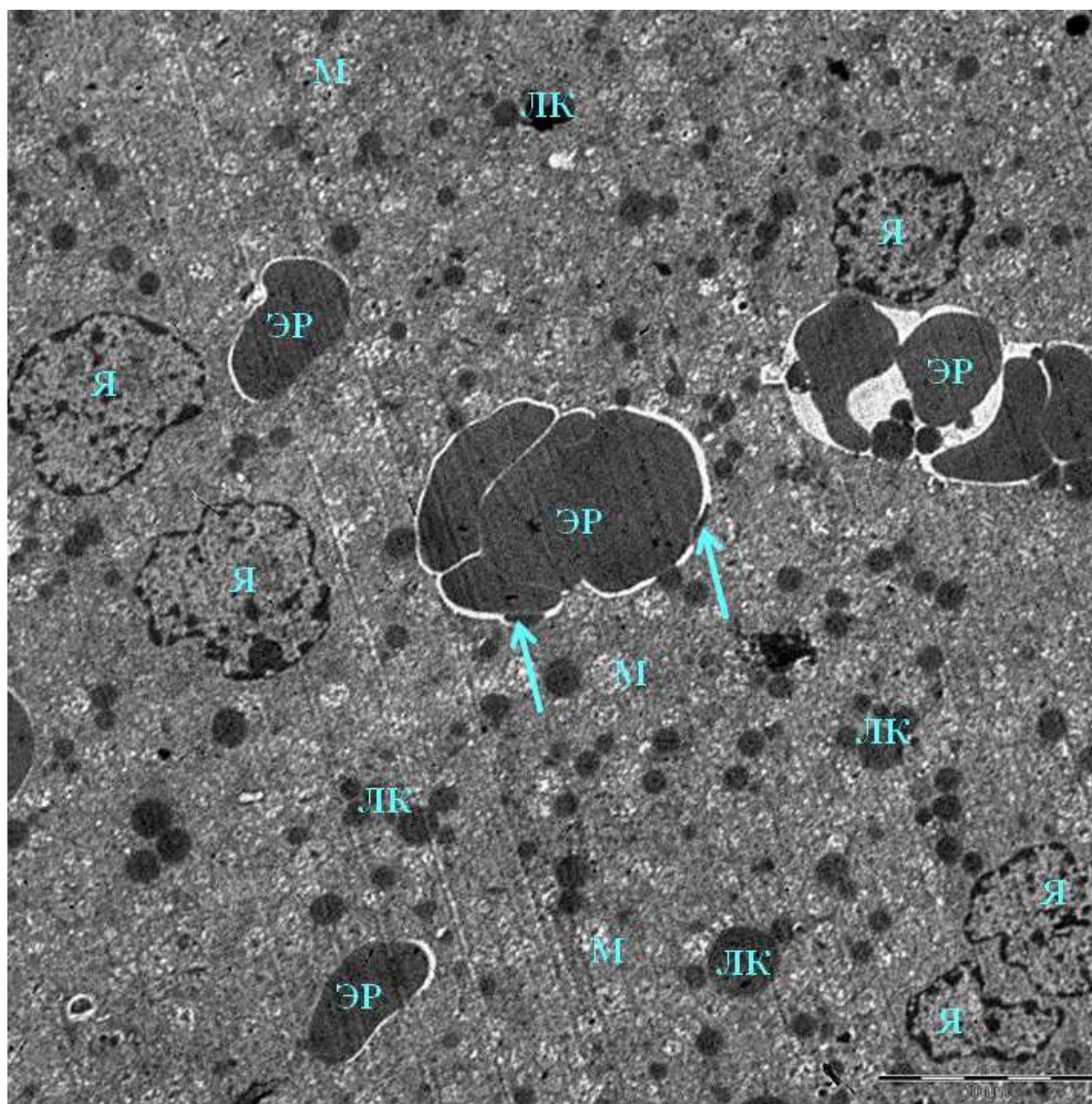


Рис. 58. Ультраструктура кортикостероцитов наружной части пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

Границы клеток плохо визуализируются. Ядра (Я) с неровными контурами и преобладанием эухроматина. Цитоплазма средней электронной плотности. В ней диффузно расположены митохондрии (М), многие из которых имеют просветленный матрикс, и небольшие липидные капли (ЛК) высокой электронной плотности. Среди клеток располагаются капилляры, с тонким эндотелием (ядра эндотелиоцитов указаны стрелками), со стазом и сладжем эритроцитов (ЭР) в просветах.

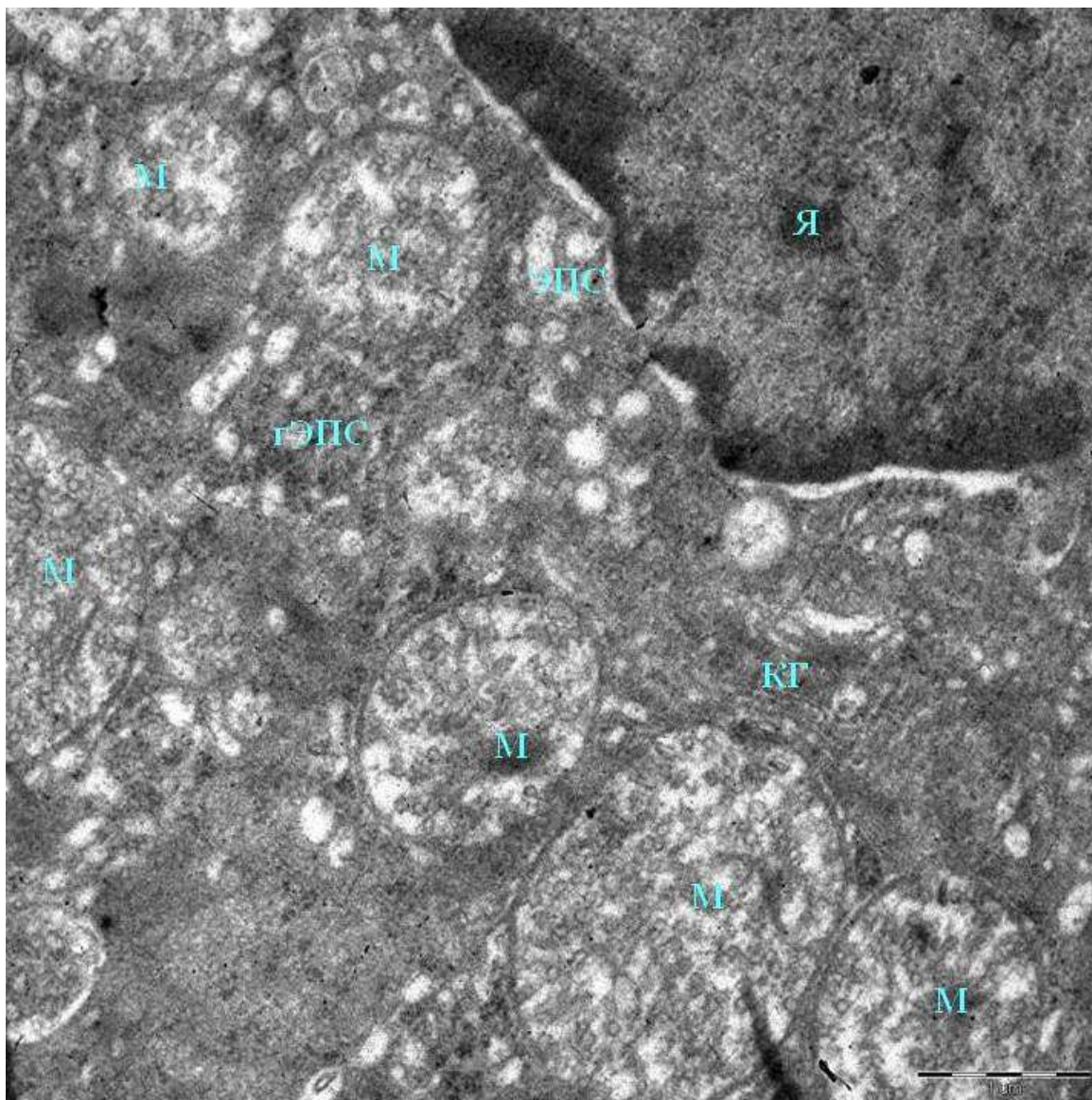


Рис. 59. Ультраструктура кортикостероцита пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

В парануклеарной области расширенные каналцы ЭПС, заполненные рыхлым содержимым низкой электронной плотности, и хорошо выраженный комплекс Гольджи (КГ). В цитоплазме также встречаются расширенные каналцы гЭПС. Митохондрии (М) круглой и овальной формы, крупных размеров с везикулярными кристами и отеком матрикса.

У крыс группы ДДТ P0-P42 в пучковой зоне кортикостероциты характеризовались меньшими размерами клеток (табл. 9). Ядра округлой формы характеризовались высоким содержанием эухроматина. В некоторых клетках в

парануклеарной области наблюдался умеренно развитый комплекс Гольджи. Митохондрии крупных размеров с везикулярными кристами располагались диффузно в цитоплазме. У митохондрий часто наблюдался умеренный отек матрикса. Липидные капли низкой электронной плотности имели, как правило, более крупный размер (табл. 9). Наблюдались как контакт липидных капель с митохондриями, так и слияние липидных капель (рис. 60). По сравнению с предыдущими группами в клетках встречались небольшого размера первичные зрелые лизосомы высокой электронной плотности (рис. 60). Также выявлено большее по сравнению с группой ДДТ Е0-Р42 количество кортикостероцитов, имеющих уплотненные с неровными контурами ядра, крупные митохондрии с отеком матрикса и деструкцией крист, а также цитоплазму очень высокой электронной плотности (рис. 61). Как и в группе ДДТ Е0-Р42 встречались очаги кровоизлияний и участки дискомплексации пучковой зоны с аналогичной структурой клеток.

Заключение. У крыс группы ДДТ Е0-Р42 выявлены дистрофия и гибель клеток, особенно в участках с нарушениями гемоциркуляции. Также отмечается регенерация участков пучковой зоны с признаками развития стероидогенной активности. В других участках пучковой зоны резко выражены синтетические процессы. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 также выявлялись дистрофически измененные клетки. Но синтетические процессы в целом, были выражены слабее.

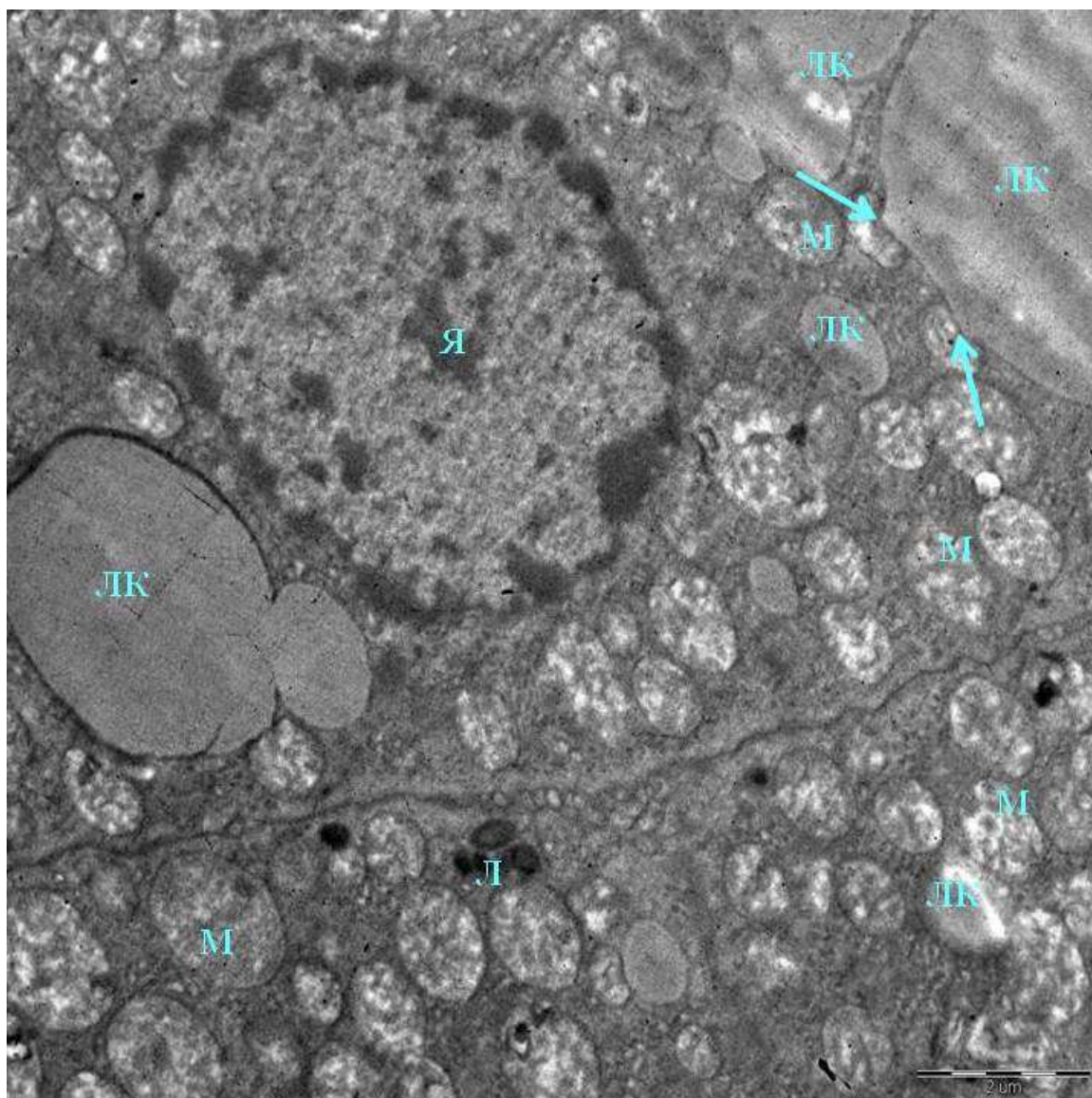


Рис. 60. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки (ДДТ P0-P42).

Ядро (Я) овальной формы с неровным контуром и преобладанием эухроматина. Цитоплазма умеренной электронной плотности. Митохондрии (М) в основном с отеком матрикса. Липидные капли крупные низкой электронной плотности. Отмечается слияние липидных капель (слева), а также их контакт с митохондриями (указан стрелками). В цитоплазме присутствуют лизосомы высокой электронной плотности (Л).

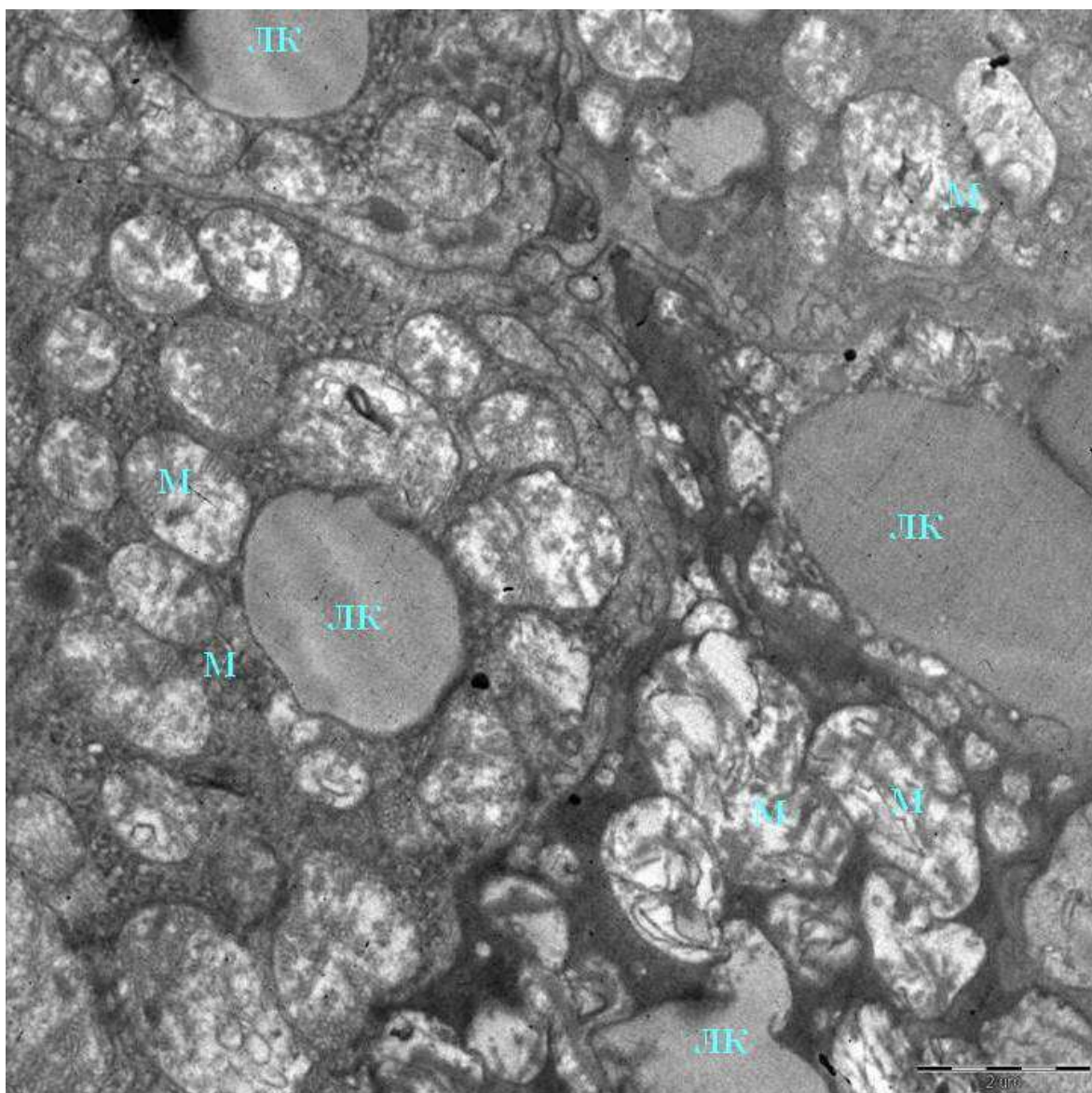


Рис. 61. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки (ДДТ P0-P42).

В кортикостероците слева митохондрии с выраженным отеком матрикса контактируют с липидной каплей (ЛК). Справа кортикостероцит с повышенной осмиофильностью цитоплазмы, деструкцией крист и отеком матрикса митохондрий (М).

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов сетчатой зоны

У крыс контрольной группы в пубертатном периоде кортикостероциты сетчатой зоны характеризовались гетероморфностью. Встречались участки, состоящие из клеток с округлыми ядрами с ровными контурами, одним или двумя ядрышками, преобладанием эухроматина. Митохондрии имели круглую или овальную форму, везикулярные кристы, матрикс средней электронной плотности. Отмечалось просветление матрикса некоторых митохондрий. Содержание липидных включений было небольшим. Липидные капли характеризовались резкой осмиофильностью. В цитоплазме выявлялись множественные микропузырьки ЭПС, свободно лежащие рибосомы и гЭПС (рис. 62). Также встречались отдельные клетки с ядрами меньшего размера, имеющими неровный контур и более высокую электронную плотность хроматина, большое число митохондрий с отеком матрикса и отсутствием липидных капель в цитоплазме (рис. 63).

Помимо этого, в сетчатой зоне наблюдались участки клеток с ядрами с неровным контуром, более плотным хроматином, цитоплазмой, занятой митохондриями с резким отеком матрикса и деструкцией крист (рис. 64, 65). В таких клетках, как правило, встречаются немногочисленные крупные осмиофильные липидные включения. В целом, содержание липидных включений в цитоплазме кортикостероцитов было невелико (табл. 10).

Табл. 10.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P42) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в пубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P42	E0-P42	P0-P42
Площадь кортикостероцита, мкм^2	$66,70 \pm 3,07$	$94,45 \pm 4,72^*$	$71,85 \pm 2,08 \blacklozenge$
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	$22,00 \pm 0,51$	$24,51 \pm 0,46^*$	$22,89 \pm 0,15 \blacklozenge$
Диаметр митохондрий, мкм	$1,58 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,02^*$	$1,46 \pm 0,04 \blacklozenge$
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	$0,29 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,01^*$	$0,25 \pm 0,01 \blacklozenge$
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	$95,77 \pm 1,22$	$93,06 \pm 1,26$	$92,17 \pm 1,32$
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	$6,89 \pm 0,46$	$5,41 \pm 0,36$	$10,35 \pm 0,78^* \blacklozenge$
Диаметр липидных включений, мкм	$2,64 \pm 0,12$	$1,71 \pm 0,15^*$	$3,05 \pm 0,16 \blacklozenge$

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, $\blacklozenge$ – отличия группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

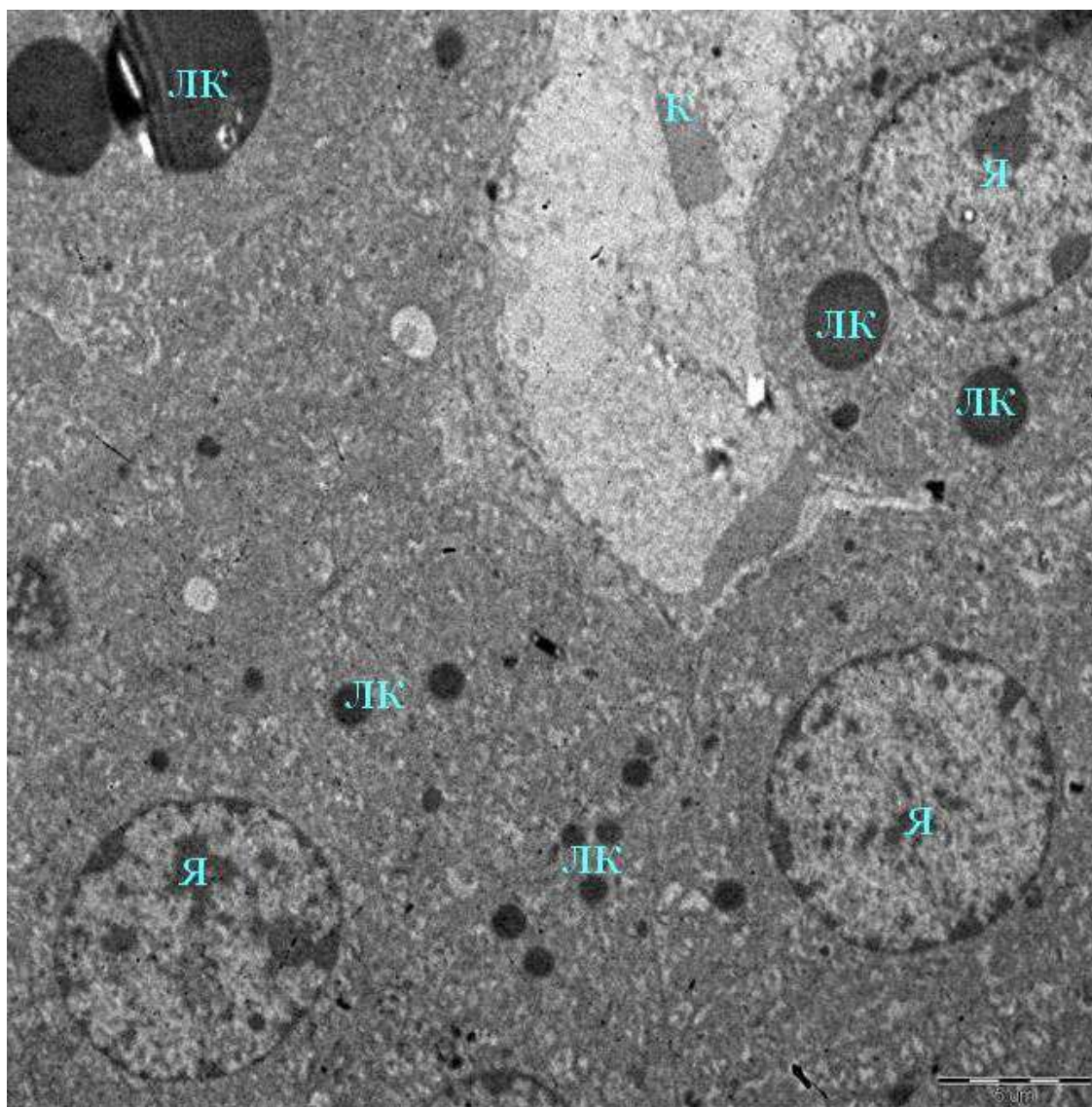


Рис. 62. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Участок сетчатой зоны с клетками с крупными ядрами (Я) с ровными контурами, преобладанием эухроматина, в цитоплазме митохондрии с отеком матрикса встречаются редко. Немногочисленные липидные капли (ЛК) высокой электронной плотности различных размеров. Просвет капилляра (К) заполнен плазмой.

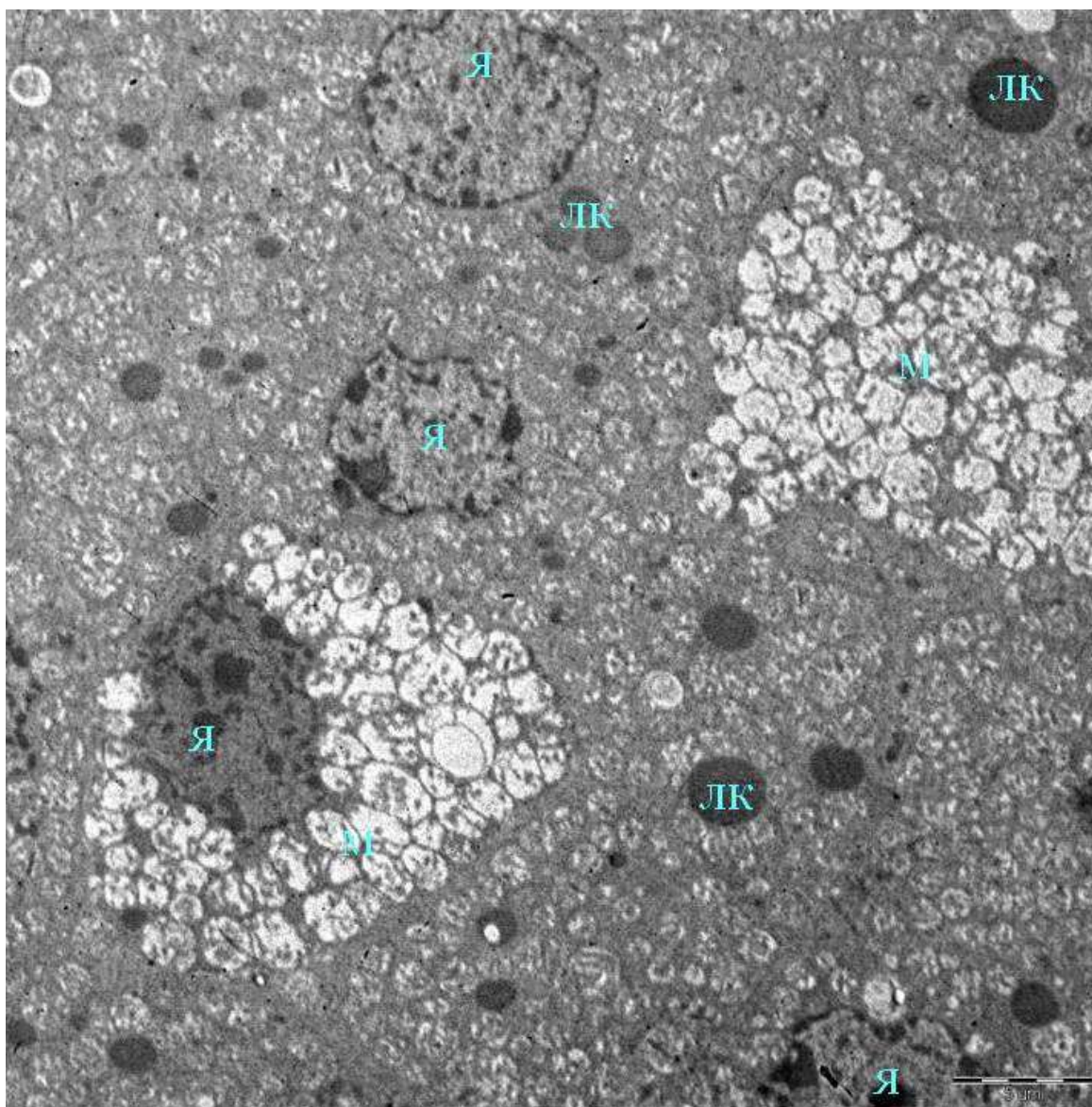


Рис. 63. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

В сетчатой зоне отдельные клетки с ядрами (Я) с неровными контурами, хроматином повышенной электронной плотности. Цитоплазма заполнена митохондриями (М) с выраженным отеком матрикса. Липидные капли (ЛК) в таких клетках не выявляются.

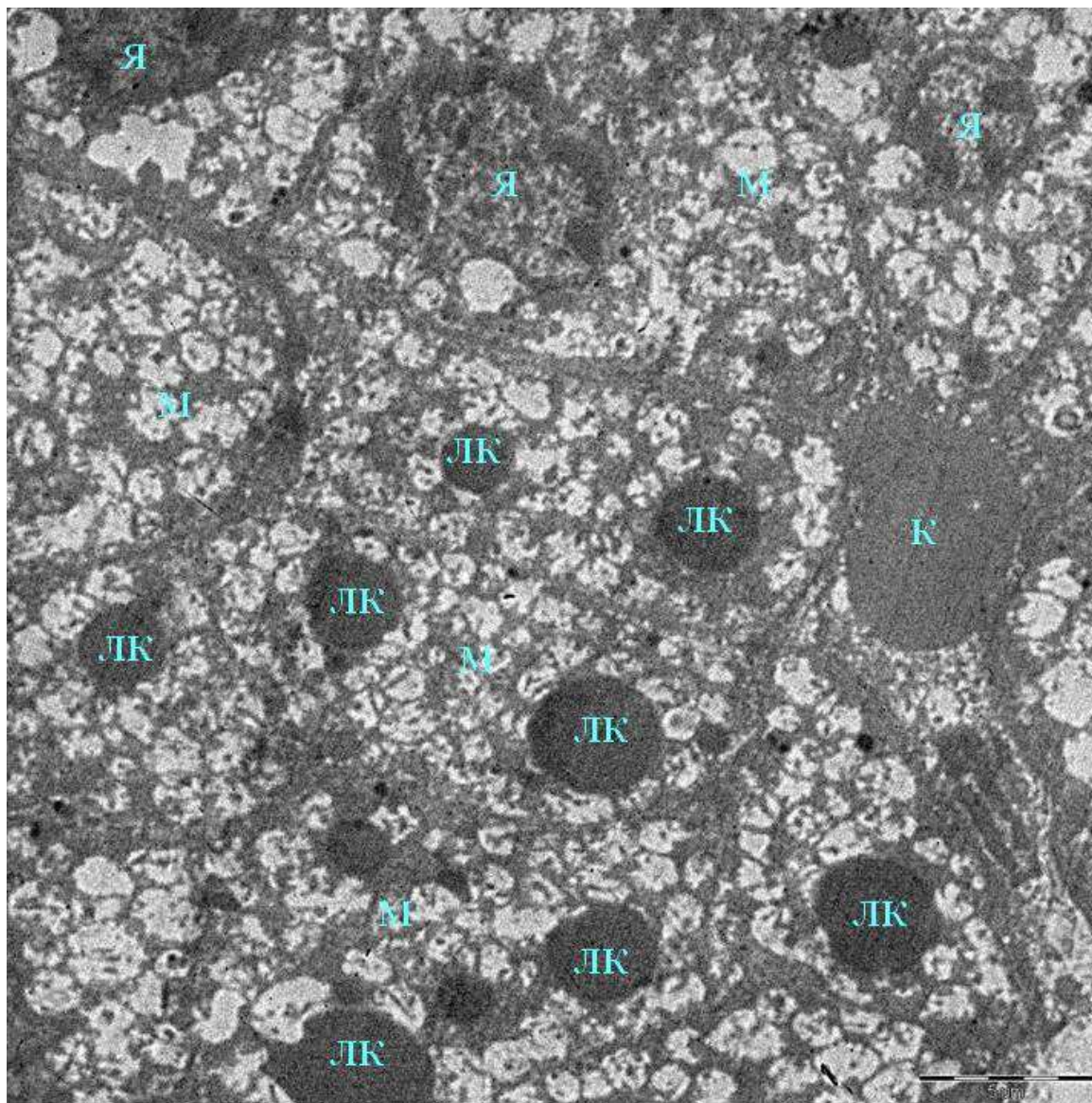


Рис. 64. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Участок сетчатой зоны с клетками с ядрами (Я) с неровными контурами. В цитоплазме митохондрии (М) и крупные липидные капли (ЛК) высокой электронной плотности. Капилляр (К) с открытым просветом, заполненным эритроцитом.

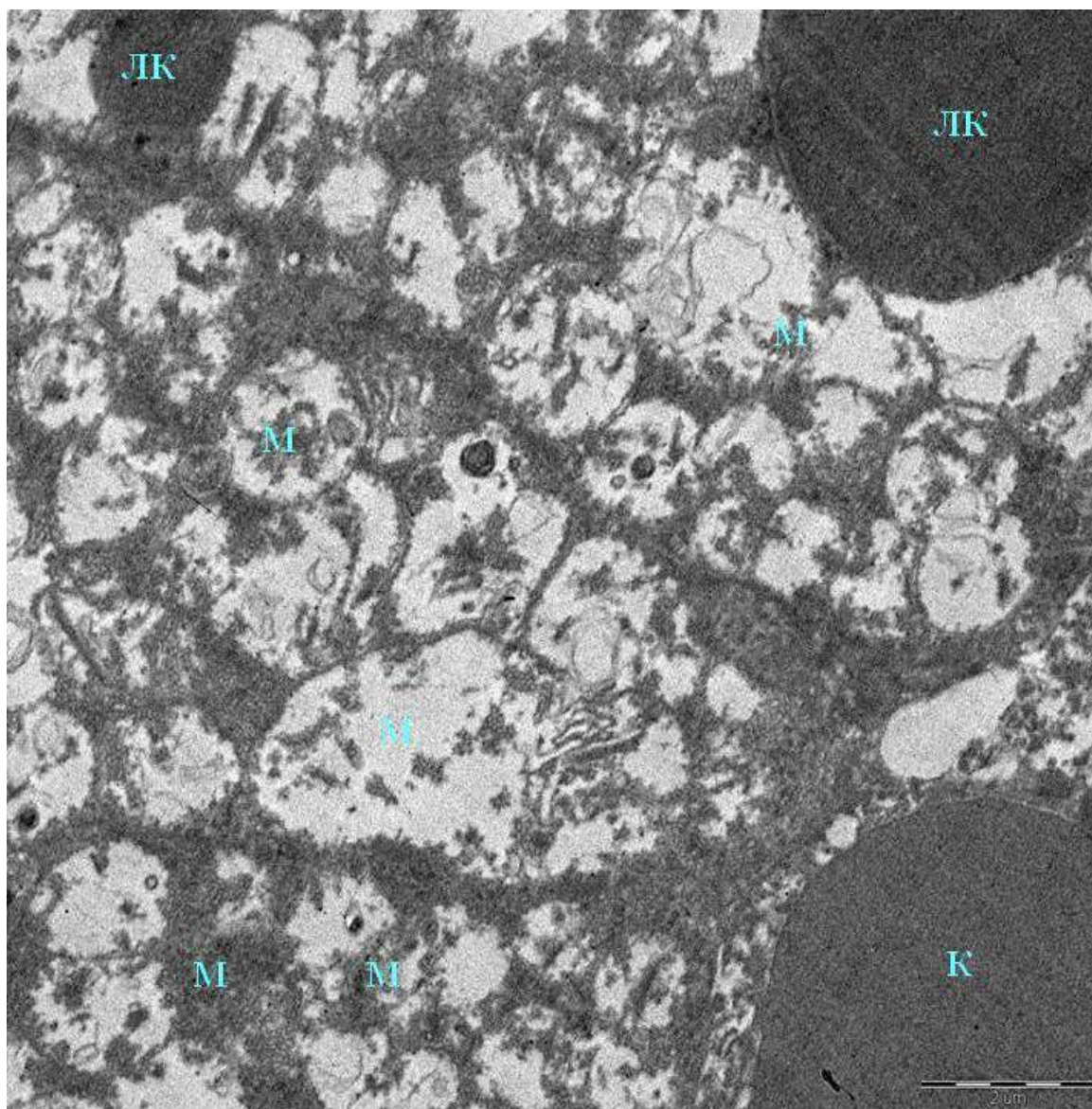


Рис. 65. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Участок цитоплазмы двух кортикостероцитов, прилежащий к капилляру (К). Митохондрии (М) имеют как круглую, так и овальную форму, и неровный контур. Резкий отек матрикса митохондрий, деструкция крист. Липидные капли (ЛК) крупные с повышенной осмиофильностью контактируют с митохондриями. Цитоплазма имеет повышенную электронную плотность.

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 кортикостероциты сетчатой зоны имели более крупные размеры, чем у крыс контрольной группы (табл. 10). Ядра также больших размеров (табл. 10) имели овальную форму и ровные контуры (рис. 66). Встречались ядра с инвагинациями ядерной оболочки. В ядрах преобладал эухроматин. Ядрышко располагалось центрально. В цитоплазме находилось большое количество митохондрий круглой формы с везикулярными кристами. Размер митохондрий был в среднем на 20% меньше, чем у крыс контрольной группы (табл. 10). Количество митохондрий в $\mu\text{км}^2$ цитоплазмы превышало контрольные значения почти на 70% (табл. 10). Отек матрикса митохондрий встречался значительно реже (рис. 66, табл. 10). ЭПС была слабо развита и представлена микропузырьками. гЭПС, свободно лежащие рибосомы, комплекс Гольджи и лизосомы практически не выявлялись. Содержание липидных включений в цитоплазме было низким (табл. 10, рис. 66). Липидные капли имели небольшой диаметр и повышенную электронную плотность. Также в сетчатой зоне наблюдались клетки с более выраженным отеком матрикса, расширением крист митохондрий (рис. 67). Содержание липидных капель в цитоплазме также было невысоким. Такие клетки встречались значительно реже, чем в контрольной группе.

Кортикостероциты сетчатой зоны у крыс группы ДДТ Р0-Р42 не отличались по размерам от контрольных значений (табл. 10). Размеры ядер также соответствовали контролю (табл. 10). Преимущественно ядра имели неровный контур и часто продолговатую форму (рис. 68). Эухроматин преобладал над гетерохроматином, который располагался, в основном, в виде глыбок у внутренней ядерной мембраны. В цитоплазме находились митохондрии округлой формы с выраженным отеком матрикса (рис. 68). Размер митохондрий и их количество не отличались от контрольных значений (табл. 10). Липидные включения были представлены каплями со средней электронной плотностью и характеризовались большими размерами, чем у крыс группы ДДТ Е0-Р42 (табл. 10). Липидные капли, как правило, сливались с митохондриями (рис. 69).

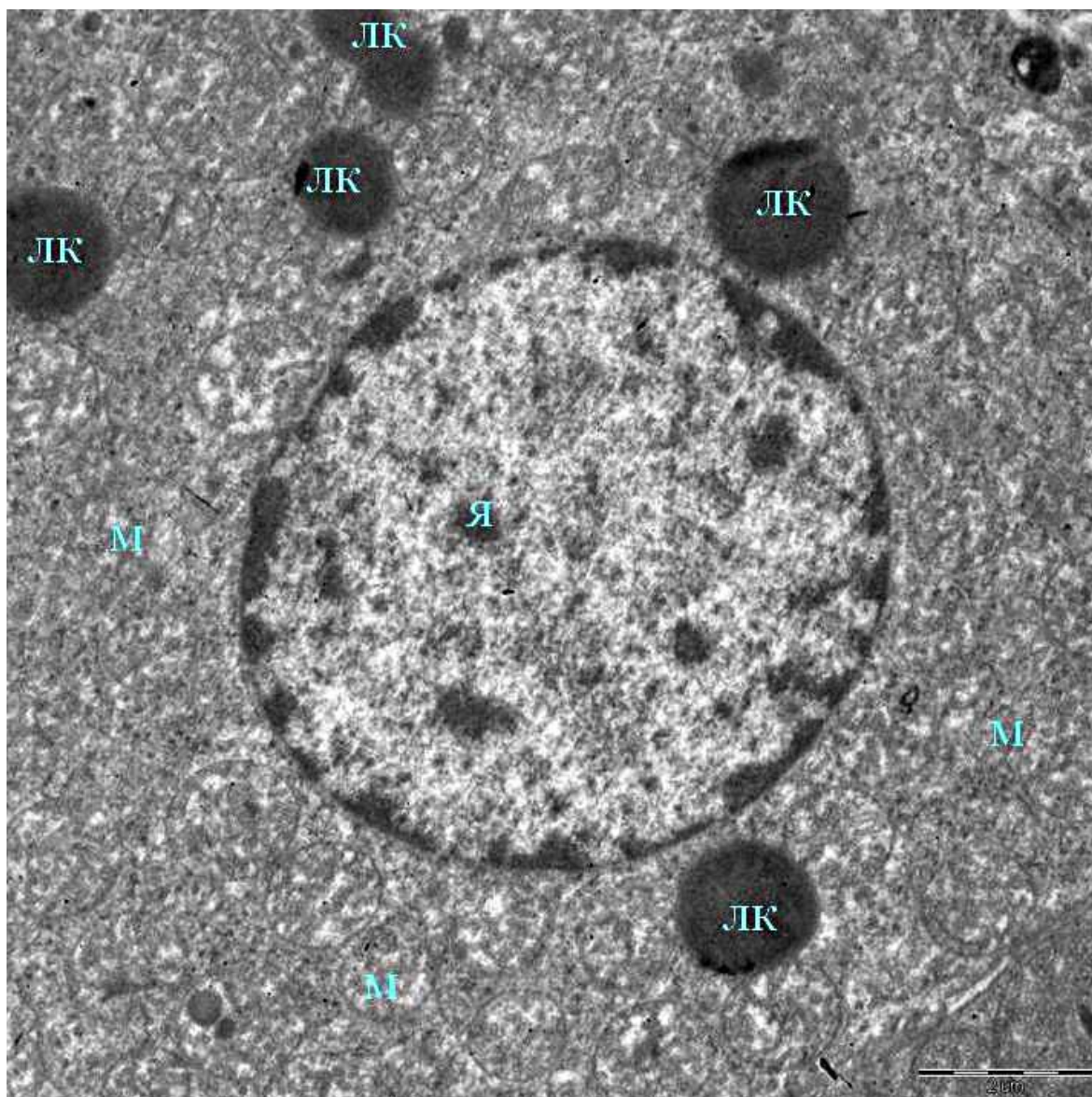


Рис. 66. Ультраструктура кортикостероцита сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42).

Ядро (Я) правильной формы с ровными контурами. Эухроматин преобладает над гетерохроматином. В цитоплазме множественные компактно лежащие митохондрии (М) с везикулярными кристами. В единичных митохондриях наблюдается просветленный матрикс. Липидные капли (ЛК) небольшого размера с высокой электронной плотностью.

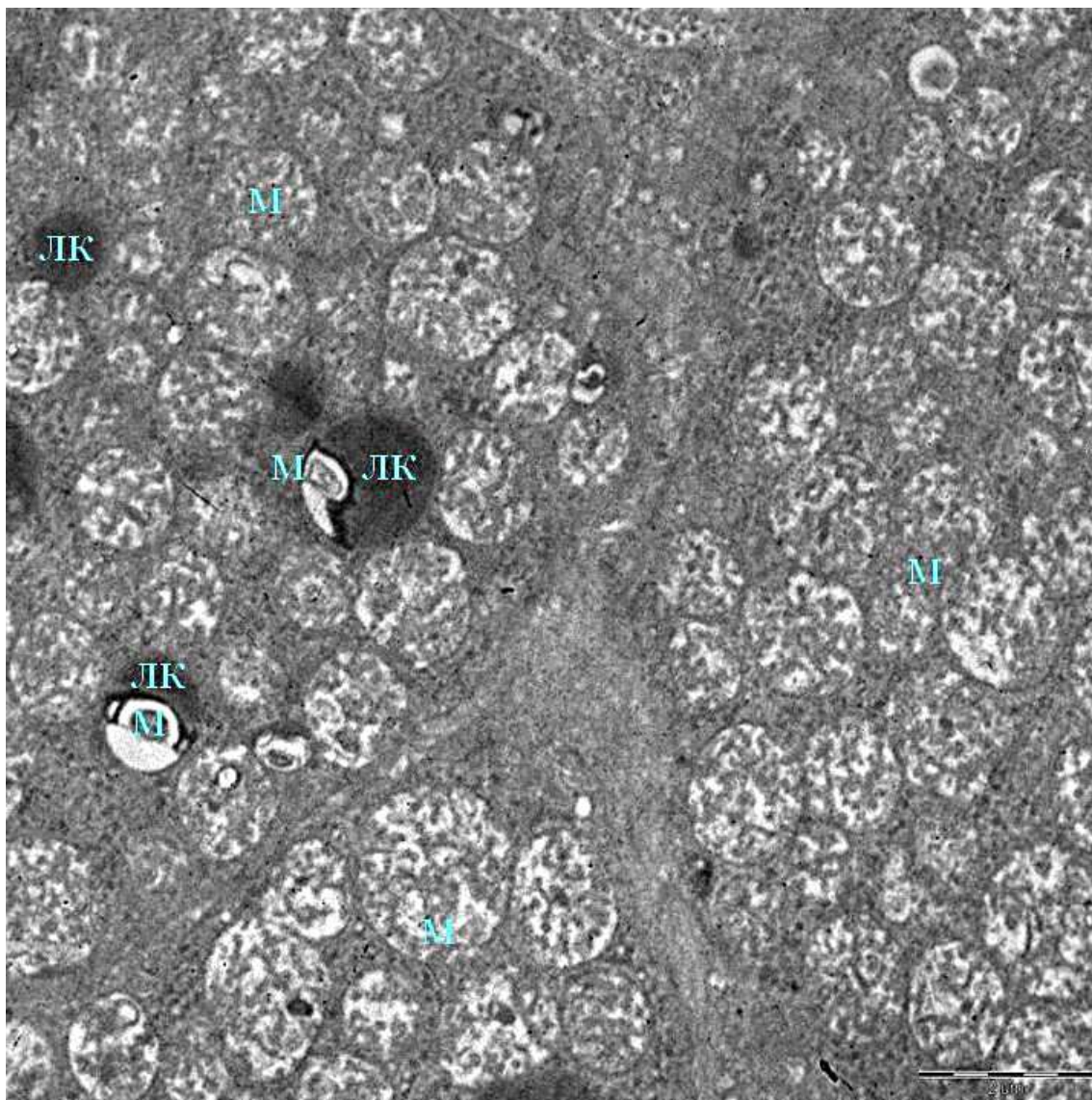


Рис. 67. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

В цитоплазме трех кортикостероцитов большое количество плотно лежащих митохондрий (М) с хорошо выраженным отеком матрикса. Отмечается слияние липидных капель (ЛК) с митохондриями.

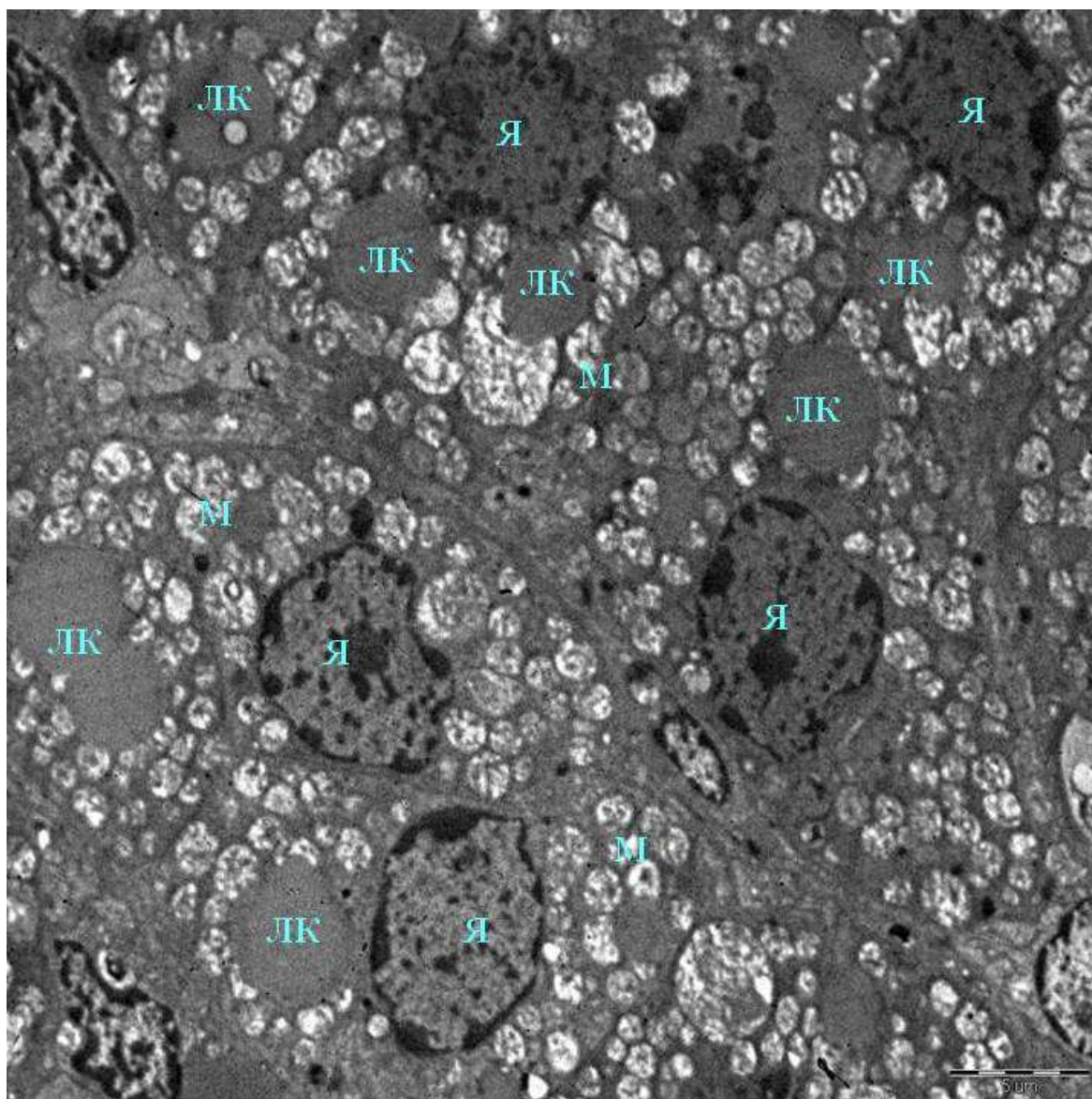


Рис. 68. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки (ДДТ Р0-Р42).

Клетки полигональной формы с овальными ядрами (Я) с инвагинациями. Митохондрии (М) с выраженным отеком матрикса. В цитоплазме крупные липидные капли (ЛК) средней электронной плотности.

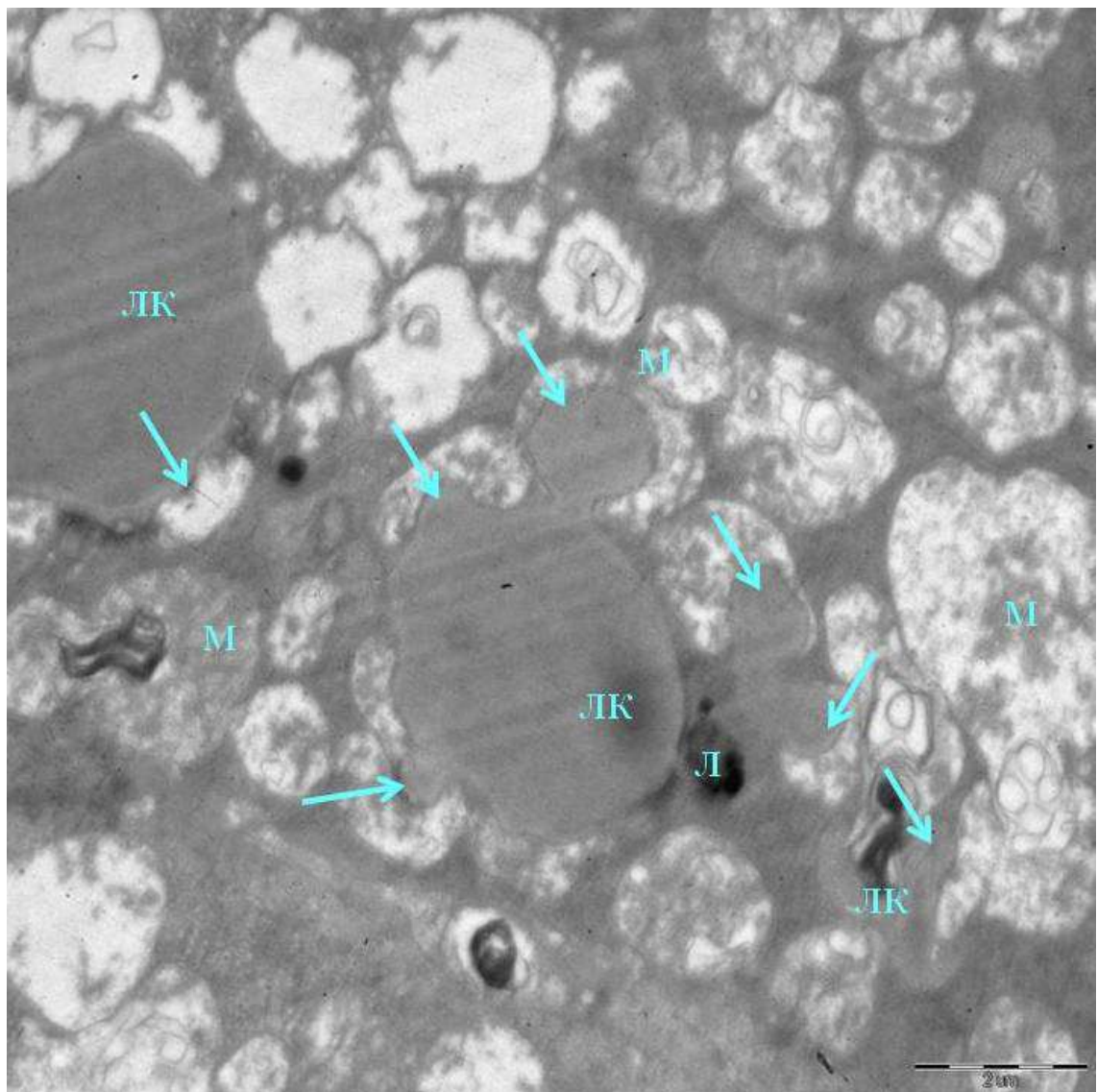


Рис. 69. Ультраструктура кортикостероцита сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки (ДДТ P0-P42).

Митохондрии с резким отеком матрикса, расширением и деструкцией крист, наблюдается контакт митохондрий с лизосомами (Л). Липидные капли (ЛК) контактируют и сливаются с митохондриями (указано стрелками).

Заключение. Сетчатая зона коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы характеризовалась гетерофункциональностью. Встречались участки клеток с пониженной и повышенной функциональной активностью. У крыс группы ДДТ E0-P42 отмечалась невысокая стероидогенная активность кортикостероцитов сетчатой зоны. При этом клетки имели большие размеры, а

количество митохондрий было значительно больше, чем в контроле. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны была более близка к контрольным параметрам. Клетки демонстрировали высокую стероидогенную активность.

3.3.3. Изменения продукции гормонов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста

У крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития отмечалось статистически значимые повышение концентрации альдостерона и 17-оксипрогестерона и снижение концентрации кортикостерона, прогестерона и эстрона в сыворотке крови по сравнению с 42-ми сутками. Уровень эстрадиола не изменялся (рис. 70).

У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном развитии (группа ДДТ Е0-Р70) в постпубертатном периоде выявлены статистически значимые повышение концентрации альдостерона и эстрадиола по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 70). Содержание в системном кровотоке кортикостерона, прогестерона и 17-оксипрогестерона уменьшилось по сравнению с 42-ми сутками, эстрона – не изменялось (рис. 70). По сравнению с возрастным контролем выявлены более низкое содержание эстрона и 17-оксипрогестерона и повышенный уровень эстрадиола, а также прогестерона (рис. 70).

У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в постнатальном развитии (группа ДДТ Р0-Р70) на 70-ые сутки увеличилась концентрация кортикостерона и уменьшились концентрации эстрона, эстрадиола, прогестерона и 17-оксипрогестерона по сравнению с 42-ыми сутками постнатального периода онтогенеза (рис. 70). По сравнению с контрольной группой наблюдались пониженные уровни альдостерона, эстрадиола, прогестерона и 17-оксипрогестерона в сыворотке крови (рис. 70). По сравнению с группой ДДТ

Е0-Р70 выявлено снижение концентраций эстрадиола, прогестерона и 17-оксипрогестерона (рис. 70).

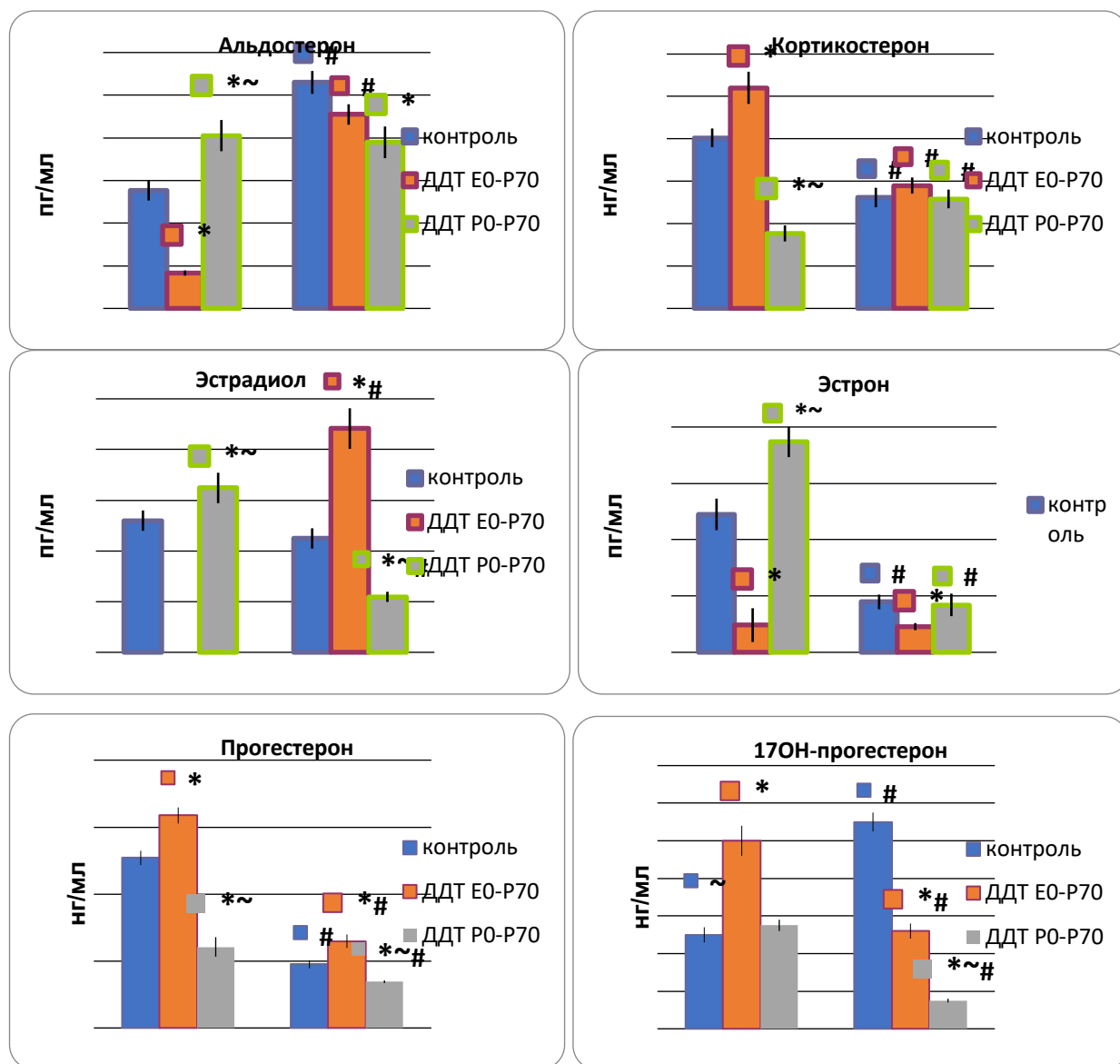


Рис. 70. Возрастные изменения продукции стероидных гормонов у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, с 42-ых по 70-ые сутки постнатального развития.

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – отличия группы ДДТ Р0-Р70 от группы ДДТ Е0-Р70, # – от предыдущего срока исследования.

Заключение. У крыс контрольной группы после наступления половой зрелости к моменту наивысшего развития надпочечника произошло изменение продукции всех стероидных гормонов за исключением эстрадиола. У крыс группы ДДТ Е0-Р70 была изменена возрастная динамика эстрогенов и проме-

жуточного метаболита стероидогенеза 17-оксипрогестерона. У крыс группы ДДТ Р0-Р70 возрастная динамика альдостерона, кортикостерона, эстрадиол и эстрона отличалась и от группы ДДТ Е0-Р70, а альдостерона, кортикостерона и 17-оксипрогестерона – от контрольной группы. Общей чертой опытных групп был приблизительно одинаковый уровень продукции альдостерона, кортикостерона и эстрона на 70-ые сутки. Единственным гормоном, чье содержание в сыворотке крови нормализовалось у обеих опытных групп к 70-ым суткам, был кортикостерон. У крыс группы ДДТ Е0-Р70 выявлено увеличение синтеза эстрадиола.

3.3.4. Изменения ультраструктуры кортикостероцитов коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эندокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов клубочковой зоны

У крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития выявлены уменьшение размеров клеток по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 11). Размер ядер не изменялся (табл. 11). Ядра характеризовались преобладанием эухроматина и, как правило, центрально расположенным ядрышком. Цитоплазма имела умеренную электронную плотность. Митохондрии уменьшились в размерах (табл. 11). В некоторых митохондриях наряду с ламеллярными встречались и тубулярные кристы (рис. 71а). Отек матрикса митохондрий встречался реже (табл. 11). Количество митохондрий в единице площади цитоплазмы увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 11). ЭПС была представлена мелкими пузырьками, диффузно расположенными в цитоплазме. Комплекс Гольджи был слабо развит. Липидные включения распределялись в клетках неравномерно и были представлены либо скоплением большого числа липидных капель низкой электронной плот-

ности, редко контактирующими с митохондриями, либо единичными каплями, либо отсутствовали (рис. 71). В среднем содержание липидных включений уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 11). Лизосомы практически не наблюдались. На плазматических мембранах клеток имелись немногочисленные микроворсинки. Просветы капилляров были заполнены плазмой.

Табл. 11.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P70) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в постпубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P70	E0-P70	P0-P70
Площадь кортикостероцита, мкм^2	82,92 $\pm$ 2,60#	82,49 $\pm$ 2,24	75,41 $\pm$ 1,80*♦#
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	27,01 $\pm$ 0,11	26,57 $\pm$ 0,40	26,62 $\pm$ 0,31
Диаметр митохондрий, мкм	0,88 $\pm$ 0,02#	0,94 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,05*
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	0,66 $\pm$ 0,04#	0,47 $\pm$ 0,03*#	0,33 $\pm$ 0,02*#
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	30,22 $\pm$ 1,03#	11,23 $\pm$ 1,10*	2,63 $\pm$ 0,20*#♦
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	18,72 $\pm$ 0,15#	13,82 $\pm$ 1,28*#	5,40 $\pm$ 0,50♦
Диаметр липидных включений, мкм	1,41 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,04	1,51 $\pm$ 0,13#

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70, # – от предыдущего срока исследования.

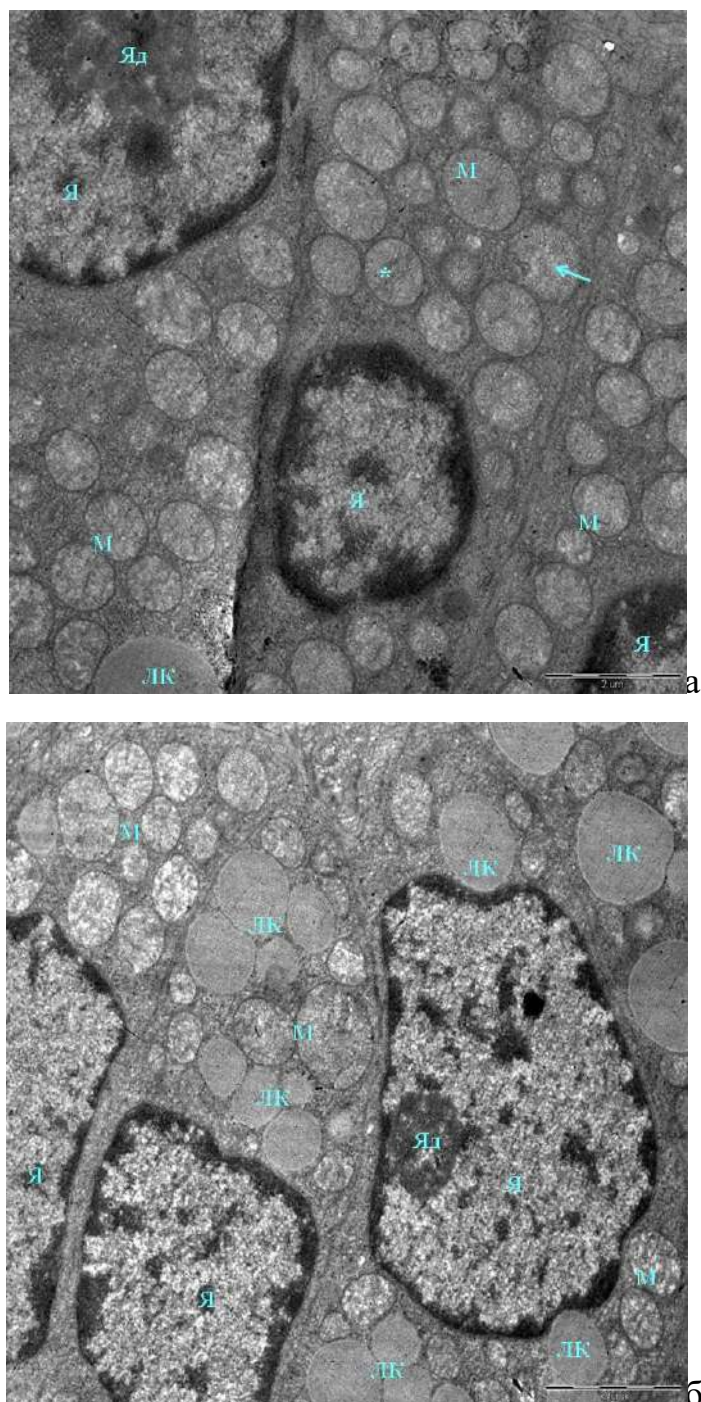


Рис. 71. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития.

а – клетки удлинённой формы, ядра (Я) расположены эксцентрично, митохондрии овальной формы небольшого размера, кристы ламеллярные, тубулярные (указаны *) и везикулярные (указаны стрелками), крайне мало липидных капель (ЛК); б – содержание липидных капель (ЛК) более высокое, чаще встречаются митохондрии (М) с отеком матрикса.

У крыс группы ДДТ Е0-Р70 размеры кортикостероцитов и их ядер не изменялись по сравнению с предыдущим сроком исследования и не отличались от значений контрольной группы (табл. 11). Ядра овальной формы характеризовались преобладанием эухроматина (рис. 72). Ядрышко чаще располагалось центрально. ЭПС была представлена микропузырьками и канальцами и располагалась диффузно в цитоплазме. В парануклеарной области располагался умеренно развитый комплекс Гольджи. Митохондрии имели овальную и продолговатую формы (рис. 72). Их размеры не изменялись по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовали значениям контрольной группы (табл. 11). В некоторых митохондриях отмечалось просветление содержимого крист или матрикса. Их относительное количество было значительно меньше контрольных значений. Количество митохондрий в $\mu\text{км}^2$ площади цитоплазмы уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования, но было меньше контрольных значений (табл. 11). Свободно лежащие рибосомы в цитоплазме встречались реже. Выявлялись единичные лизосомы. В кортикостероцитах уменьшилось содержание липидных включений. По сравнению с контрольной группой их было немного меньше (табл. 11). Они были представлены липидными каплями небольшого диаметра пониженной электронной плотности (рис. 72). Микроворсинки на поверхности плазматических мембран, контактирующих с перикапиллярным пространством, были слабо выражены. Встречались капилляры с открытым и закрытым просветом. Открытые просветы капилляров были заполнены плазмой.

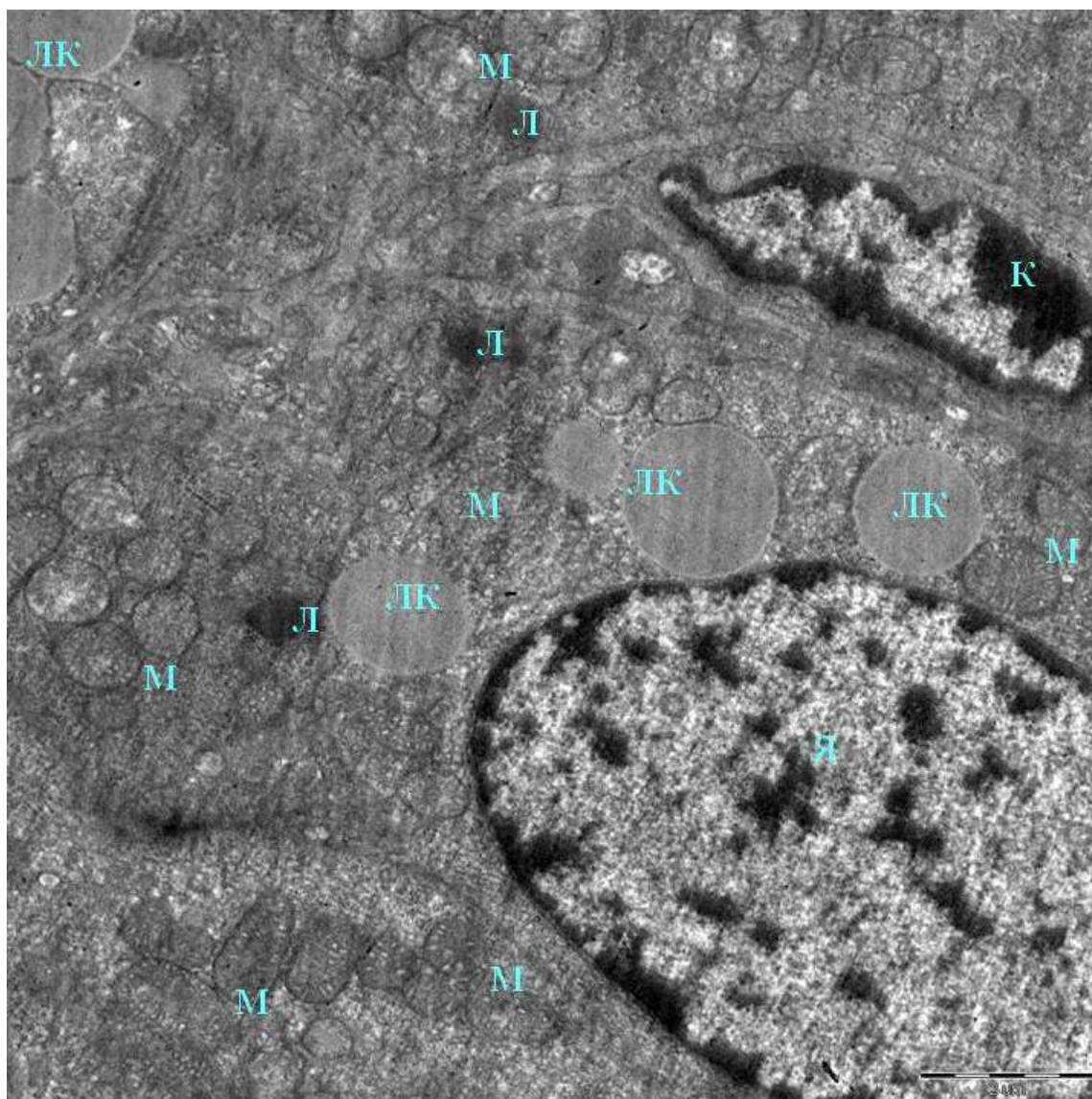


Рис. 72. Ультраструктура кортикостероцитов и капилляра (К) с закрытым просветом клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р70).

Ядро (Я) кортикостероцита овальной формы с дисперсным расположением глыбок гетерохроматина. Митохондрии (М) овальной формы с ламеллярными кристами и электронно-плотным матриксом. Единичные лизосомы (Л) и липидные капли (ЛК).

У крыс группы ДДТ Р0-Р70 размеры кортикостероцитов уменьшились по сравнению с предыдущим сроком исследования и были меньше контрольных значений и значений группы ДДТ Е0-Р70 (табл. 11).

Ядра в клетках располагались эксцентрично. В структуре ядра преобладал эухроматин. Ядрышко располагалось центрально. Расширения перинуклеарного пространства не наблюдалось (рис. 73). Количество митохондрий в клетках уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования в отличие от контрольной группы. Число митохондрий в мкм^2 площади цитоплазмы было наименьшим в сравниваемых группах (табл. 11). Размеры митохондрий не изменялись, но были больше, чем в контроле (табл. 11). Они имели как округлую, так и удлинённую формы. Матрикс митохондрий имел меньшую электронную плотность, чем в группе ДДТ Е0-Р70, но локальный отек матрикса митохондрий встречался крайне редко (табл. 11, рис. 73). Кристы митохондрий характеризовались гетероморфностью: встречались ламеллярные, тубулярные, а также везикулярные кристы. ЭПС была хорошо выражена. В цитоплазме встречались свободно лежащие рибосомы. Лизосомы практически не выявлялись. Содержание липидов было наиболее низким в сравниваемых группах, как и в предыдущем сроке исследования (табл. 11). Липидные капли имели более высокую электронную плотность, чем в группе ДДТ Е0-Р70 (рис. 73). Их размеры увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования и не отличались от контрольных значений (табл. 11).

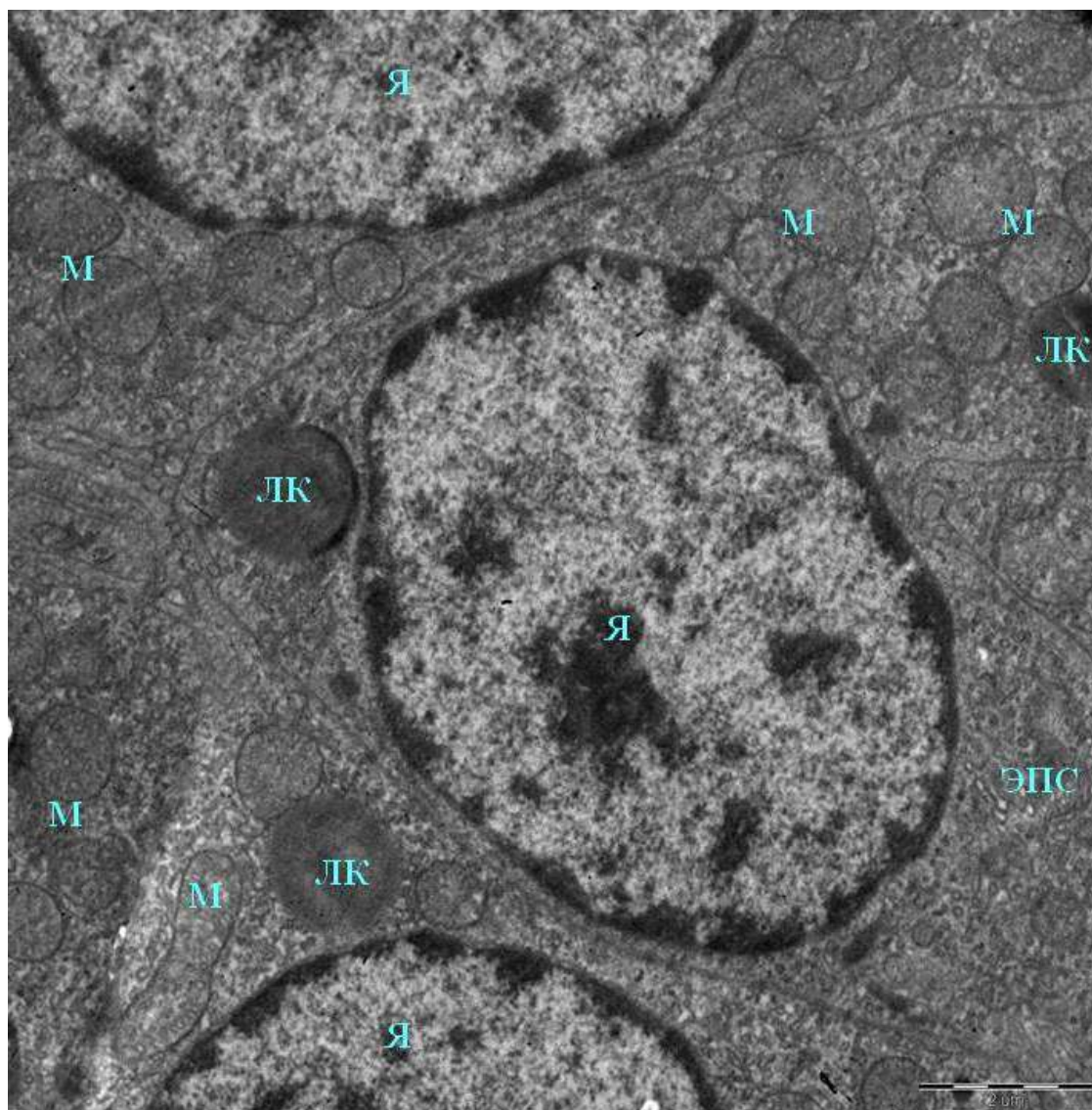


Рис. 73. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ Р0-Р70).

Ядра (Я) с преобладанием эухроматина, в цитоплазме множественные микропузырьки и каналцы ЭПС, митохондрии (М) небольшого размера овальной или продолговатой формы с разнообразными по структуре кристами и электронно-плотным матриксом, единичные липидные капли (ЛК) повышенной электронной плотности.

Заключение. В клубочковой зоне у крыс контрольной группы выявлены следующие возрастные структурные изменения: уменьшение размеров и числа митохондрий, отека матрикса митохондрий, появление митохондрий с тубулярными и везикулярными кристами, снижение содержания липидов на фоне

уменьшения размеров клеток. У крыс группы ДДТ Е0-Р70 отмечались схожие возрастные изменения за исключением сохранения более крупных размеров клеток. Отличием от контрольной группы было меньшее число митохондрий в клетках, меньшая доля митохондрий с отеком матрикса и большее содержание липидов в цитоплазме, что указывает на относительное снижение функциональной активности клеток. У крыс группы ДДТ Р0-Р70 возрастные изменения во многом соответствовали контрольной группе.

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов пучковой зоны

У крыс контрольной группы выявлено увеличение размеров кортикостероцитов по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 12). Ядра имели небольшие инвагинации. Вдоль ядерной оболочки располагались глыбки гетерохроматина (рис. 74). Размер ядер не изменялся по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 12). Митохондрии имели круглую или овальную форму (рис. 74). Их размеры увеличились (табл. 12). Кристы преимущественно имели везикулярное строение (рис. 74). Матрикс митохондрий имел пониженную электронную плотность (рис. 74). Отек матрикса митохондрий встречался значительно реже (табл. 12). Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы уменьшилось пропорционально увеличению их размера (табл. 12). Матрикс цитоплазмы имел среднюю электронную плотность. Клетки содержали хорошо развитую ЭПС. Комплекс Гольджи был слабо развит. гЭПС и свободно лежащие рибосомы встречались редко. Содержание липидов в цитоплазме увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 12). Липидные включения представляли собой округлые образования средней и высокой электронной плотности, их размер был больше, чем на 42-ые сутки постнатального развития (табл. 12). Наблюдался контакт липидных капель с митохондриями (рис. 74). Лизосомы практически не выявлялись.

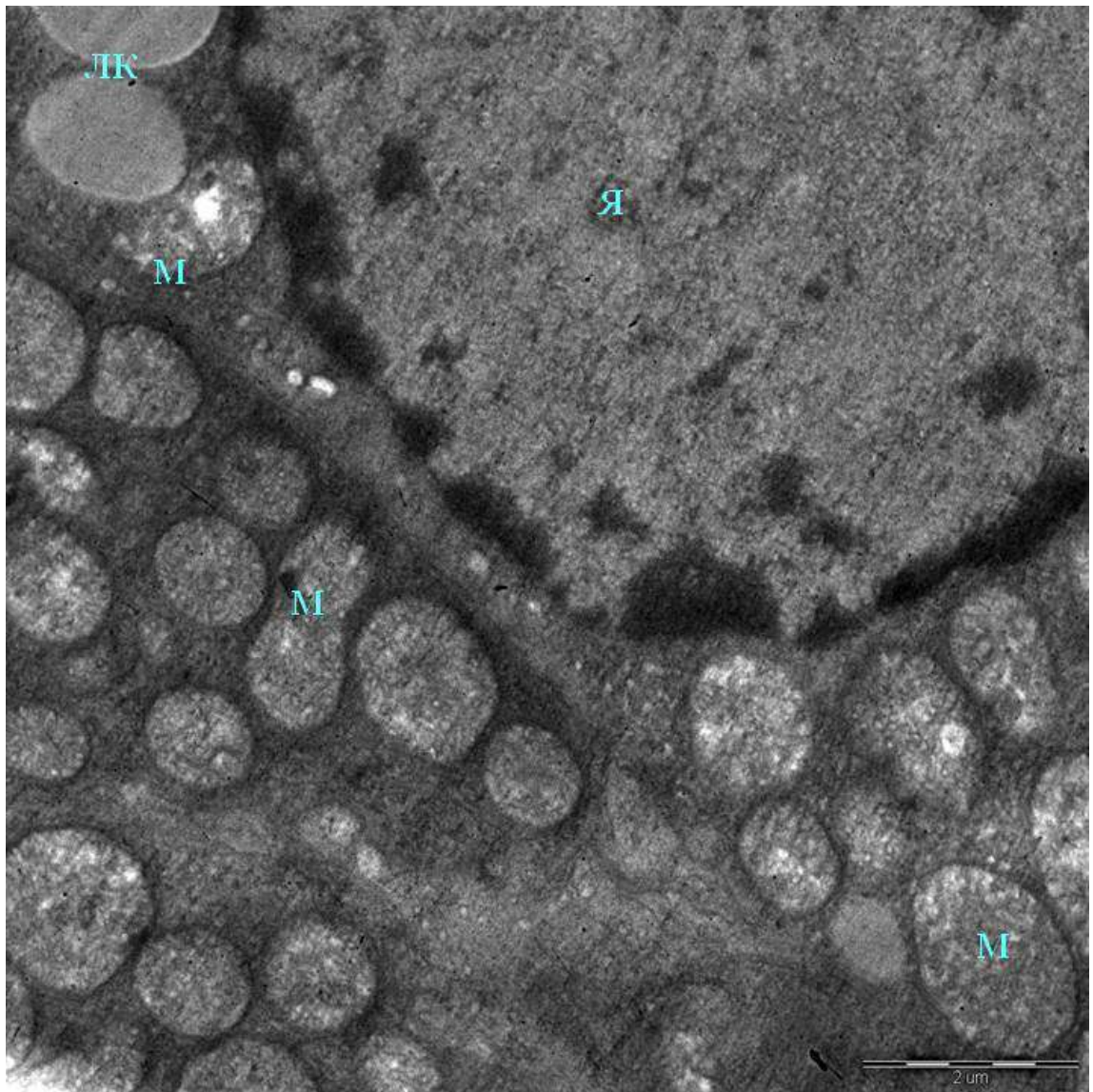


Рис. 74. Ультраструктура кортикостероцита пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития.

Ядро (Я) округлой формы с периферически расположенными глыбками гетерохроматина. Митохондрии (М) с везикулярными кристами, отек матрикса наблюдается редко. Контакт липидной капли (ЛК) с митохондрией.

Табл. 12.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P70) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в постпубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P70	E0-P70	P0-P70
Площадь кортикостероцита, мкм^2	134,79 $\pm$ 1,91#	151,57 $\pm$ 3,75*#	121,09 $\pm$ 6,14*♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	30,47 $\pm$ 0,34	31,43 $\pm$ 0,34*#	29,98 $\pm$ 0,74♦
Диаметр митохондрий, мкм	1,32 $\pm$ 0,05#	1,47 $\pm$ 0,03*#	1,70 $\pm$ 0,07*#♦
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	0,25 $\pm$ 0,01#	0,34 $\pm$ 0,02*#	0,21 $\pm$ 0,02#♦
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	36,87 $\pm$ 1,22#	61,11 $\pm$ 3,10*	86,05 $\pm$ 2,15*♦
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	14,77 $\pm$ 0,15#	7,91 $\pm$ 0,60*	8,70 $\pm$ 0,05*
Диаметр липидных включений, мкм	1,58 $\pm$ 0,08#	2,05 $\pm$ 0,05*	1,94 $\pm$ 0,07*#

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70, # – от предыдущего срока исследования.

У крыс группы ДДТ E0-P70 к 70-ым суткам постнатального развития размеры кортикостероцитов пучковой зоны и размеры их ядер увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования, но в большей степени, чем у

крыс контрольной группы, вследствие чего превышали контрольные значения (табл. 12). Ядра располагались в клетках центрально. Ядра имели преимущественно округлую форму с инвагинациями (рис. 75). В них преобладал эухроматин. Небольшие глыбки гетерохроматина локализовались у ядерной оболочки (рис. 75). Ядрышко чаще располагалось центрально. В цитоплазме располагались множественные митохондрии овальной формы с везикулярными кристами (рис. 75). Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы уменьшилось, но было больше значений контрольной группы (табл. 12). Размер митохондрий увеличился по сравнению с предыдущим сроком исследования и превысил контрольные значения (табл. 12). Также и доля митохондрий с отеком матрикса была больше, чем в контрольной группе (табл. 12). ЭПС была хорошо выражена и представляла собой диффузно распределенные в цитоплазме микровезикулы (рис. 75). Комплекс Гольджи был слабо развит. Лизосомы встречались редко. Липидных включений в цитоплазме было меньше, чем в контрольной группе (табл. 12). Липидные включения присутствовали в цитоплазме в виде глобул средней электронной плотности, окруженных светлым ободком (рис. 75), их размер превышал контрольные значения (табл. 12). Часто наблюдался контакт и слияние липидных капель с митохондриями. Просветы капилляров были заполнены плазмой или обтурированы эритроцитами. В таких участках отмечались большая доля митохондрий с отеком матрикса и меньшее содержание липидных капель (рис. 76).

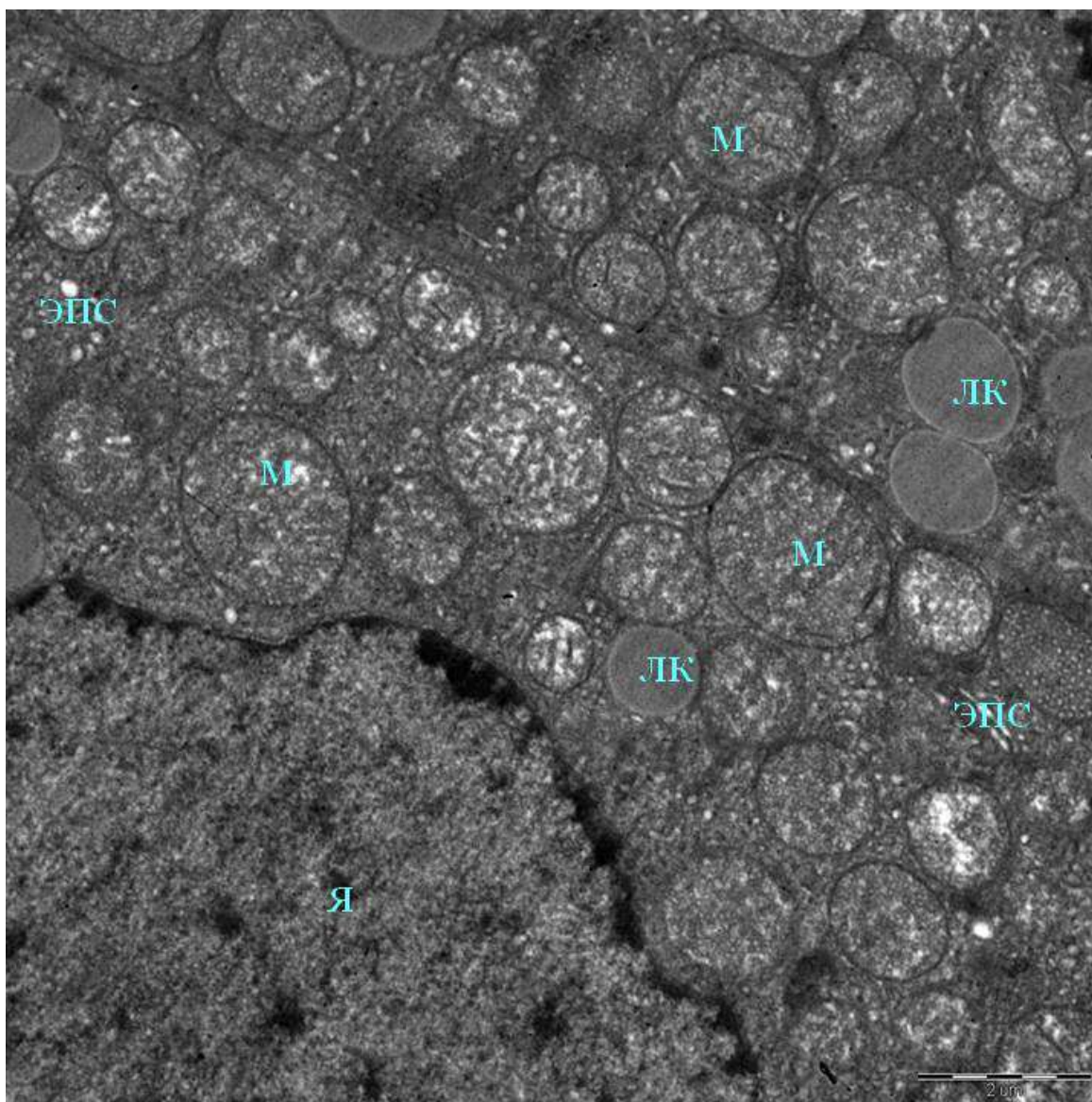


Рис. 75. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ Е0-Р70).

Ядро (Я) с резким преобладанием эухроматина. Цитоплазма с матриксом средней электронной плотности пронизана каналами ЭПС. Митохондрии (М) округлой формы с везикулярными кристами. В некоторых митохондриях отек матрикса. В цитоплазме немногочисленные липидные капли (ЛК).

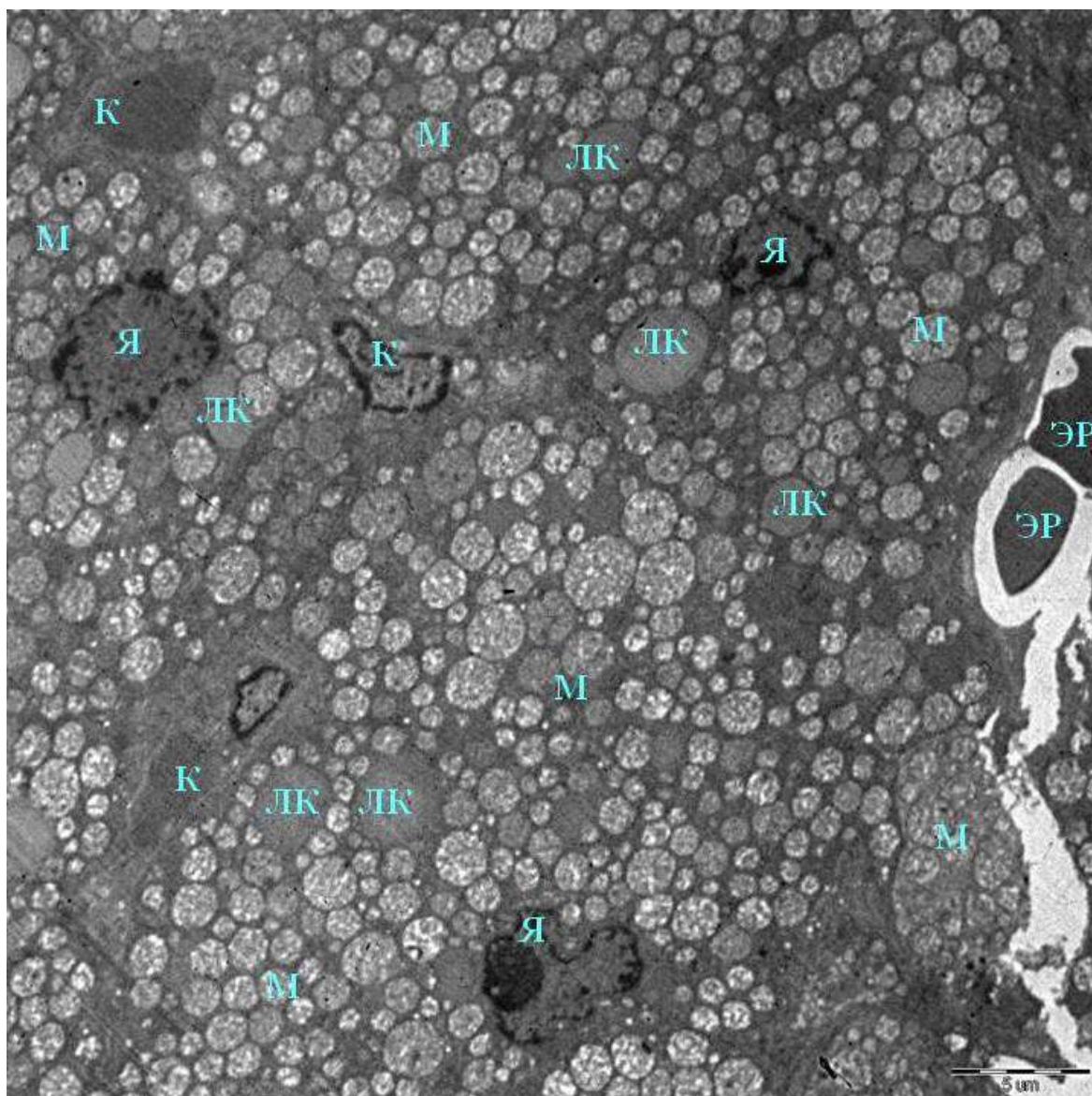


Рис. 76. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ Е0-Р70).

Участок пучковой зоны с капиллярами (К), с открытыми, заполненными плазмой, и закрытым просветом. Справа расширенный капилляр с эритроцитами в просвете. Матрикс митохондрий (М) кортикостероцитов просветлен. Немногочисленные липидные капли (ЛК) низкой электронной плотности.

У крыс группы ДДТ Р0-Р70 кортикостероциты пучковой зоны характеризовались незначительным увеличением размеров по сравнению с предыдущим сроком исследования. Их размеры были минимальными в сравниваемых группах (табл. 12). Размеры ядер соответствовали контрольным значениям (табл. 12). Ядра имели неровный контур. Глыбки гетерохроматина располагались под ядерной оболочкой. Часто встречалась эктопия ядрышка. Количество митохондрий в цитоплазме уменьшилось (табл. 12). Размеры митохондрий увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования и превышали значения контрольной группы и группы ДДТ Е0-Р70 (табл. 12). В митохондриях наряду с везикулярными наблюдались тубулярные кристы (рис. 77). У многих митохондрий отмечался отек матрикса (табл. 12). Встречались клетки с очень крупными митохондриями с резко осмиофильными мембранами, деструктивно измененными кристами и выраженным отеком матрикса (рис. 78). Канальцы ЭПС были расширены. гЭПС также была хорошо выражена (рис. 77). Отмечалось увеличение комплекса Гольджи и расширение его цистерн, заполненных содержимым низкой электронной плотности (рис. 77). В цитоплазме выявлялись немногочисленные зрелые лизосомы небольшого диаметра (рис. 77). Содержание липидных включений в цитоплазме было меньше значений контрольной группы (табл. 12). Липидные капли имели среднюю электронную плотность и более крупные размеры, чем в контроле (табл. 12). Отмечался контакт митохондрий и липидных капель. Капилляры имели открытый просвет, содержащий плазму или эритроциты.

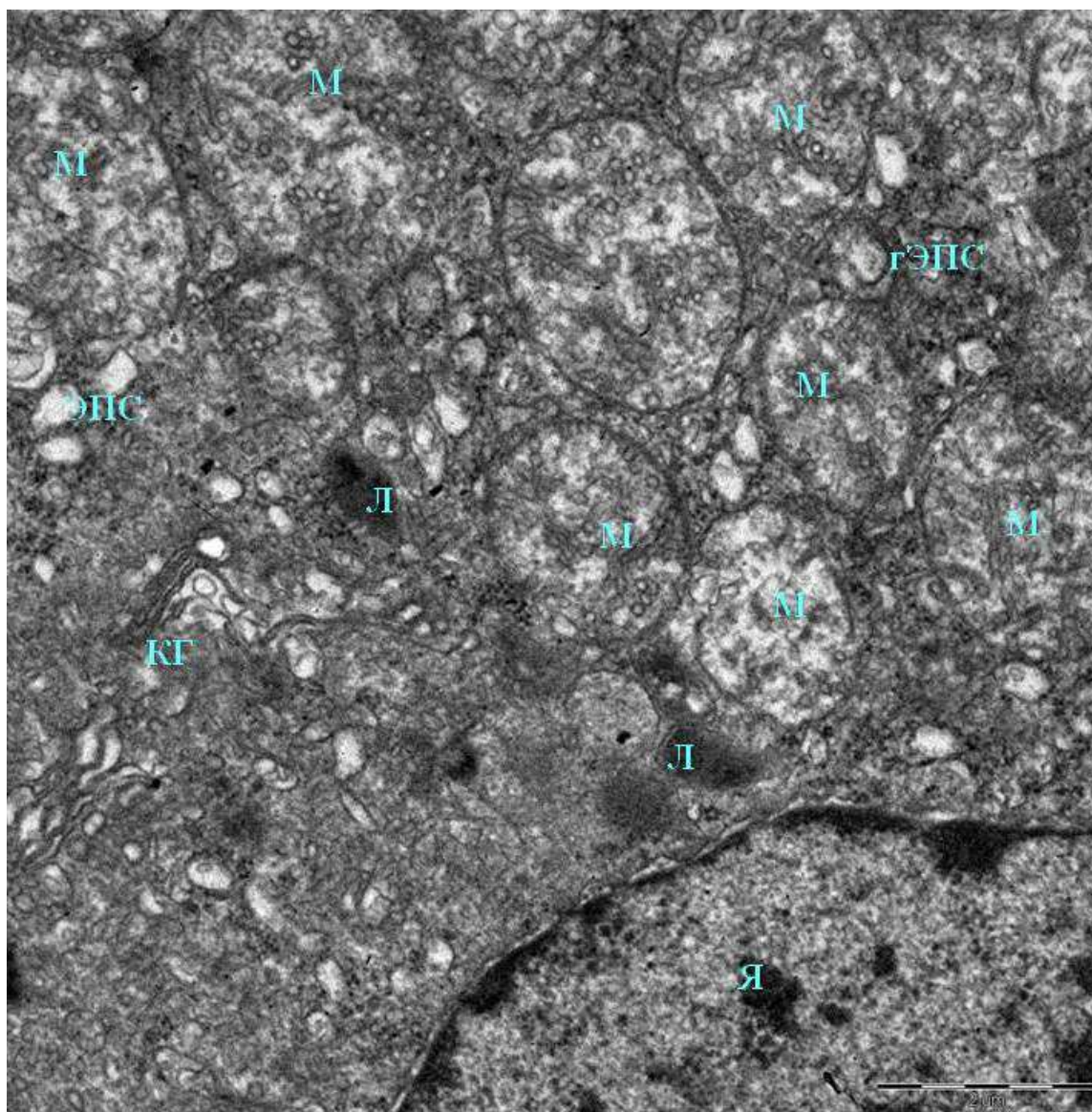


Рис. 77. Ультраструктура кортикостероцита пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ P0-P70).

Ядро (Я) с преобладанием эухроматина. В цитоплазме комплекс Гольджи (КГ) с расширенными цистернами, расширенные каналцы ЭПС. В области комплекса Гольджи находятся лизосомы (Л). Канальцы ЭПС расширены. Хорошо визуализируются участки гЭПС. Митохондрии (М) с везикулярными и тубулярными кристами и очагами просветления матрикса.

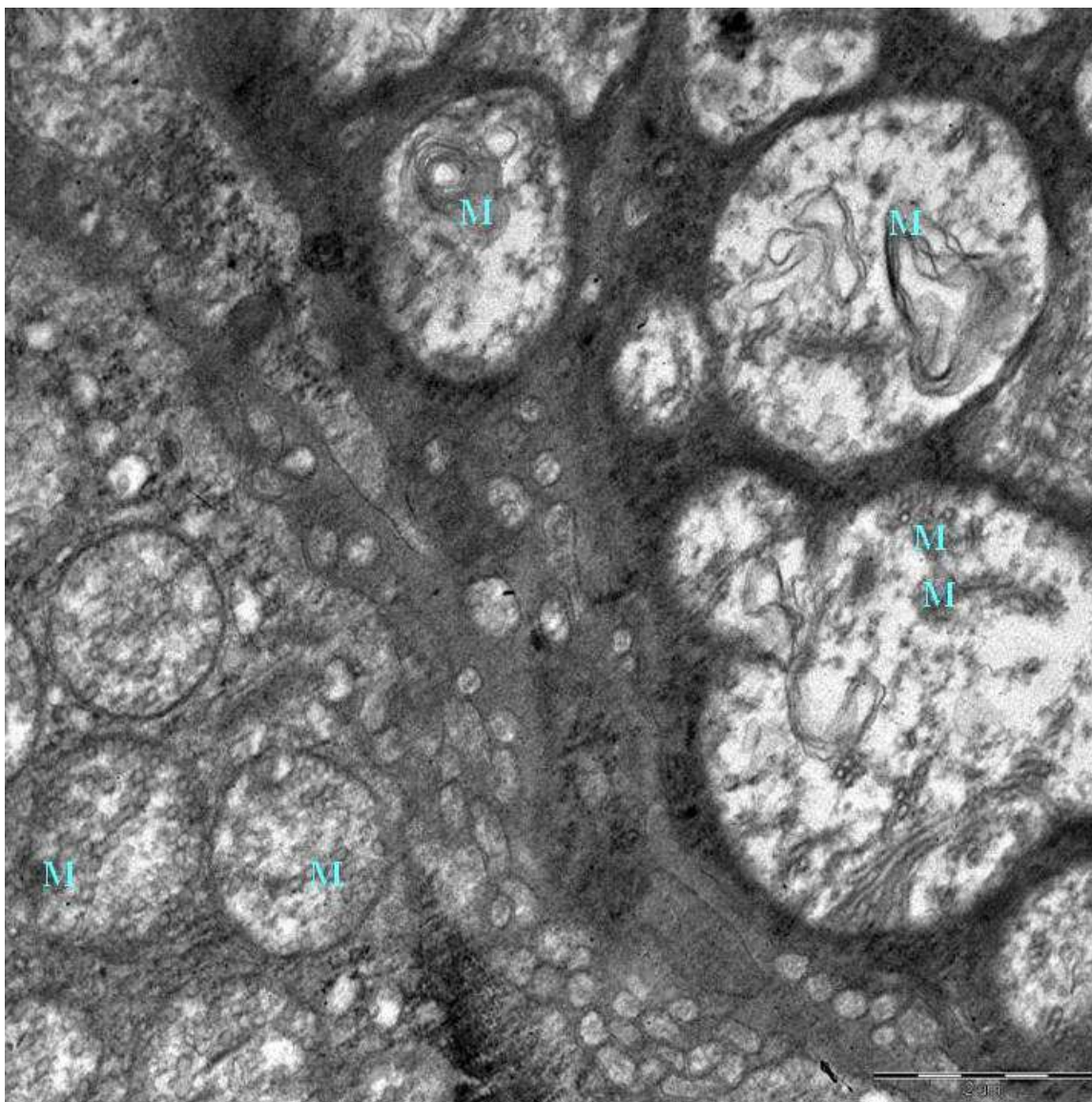


Рис. 78. Ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ на 70-ые сутки (ДДТ P0-P70).

В кортикостероците справа увеличенные в размерах митохондрии (М), деструкция крист и отек матрикса. Резко повышена электронная плотность мембранных структур.

Заключение. У крыс контрольной группы к моменту наивысшего развития органа отмечалось увеличение размеров кортикостероцитов, уменьшение числа и укрупнение митохондрий, увеличение содержания липидных включений в цитоплазме. У крыс группы ДДТ E0-P70 возрастная динамика имела много общих черт с контрольной группой, а у крыс группы ДДТ P0-P70, воз-

растные изменения ультраструктуры были слабо выражены. На 70-ые сутки постнатального развития ультраструктура кортикостероцитов пучковой зоны у крыс опытных групп отличалась по многим показателям как от контрольной группы, так и друг от друга. У крыс группы ДДТ Е0-Р70 клетки имели большие размеры, более крупные ядра и митохондрии, большее число митохондрий в цитоплазме, в том числе и с отеком матрикса, более развитую ЭПС. У крыс группы ДДТ Р0-Р70, напротив, клетки имели меньшие размеры, отек матрикса митохондрий был выражен сильнее, что вероятно, являлось основной причиной увеличения размеров митохондрий. В этой группе были ярко выражены признаки активных синтетических процессов, такие как увеличение и расширение канальцев гЭПС, ЭПС и комплекса Гольджи, усиление функционирования митохондрий.

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов сетчатой зоны

По сравнению с предыдущим сроком исследования кортикостероциты сетчатой зоны крыс контрольной группы имели более мономорфную ультраструктуру. Объем цитоплазмы уменьшился (табл. 13). В строении ядер изменений по сравнению с предыдущим сроком исследования не наблюдалось (рис. 79, табл. 13). Значительно увеличилось количество митохондрий в единице площади цитоплазмы (табл. 13). Митохондрии имели округлую форму, их размеры были уменьшены (рис. 79, табл. 13). Матрикс подавляющего большинства митохондрий был просветлен (рис. 79, табл. 13). Кристы имели везикулярную форму. Значительно уменьшилось содержание липидных включений в цитоплазме (табл. 13). Они были представлены крупными липидными каплями с повышенной электронной плотностью (рис. 79). В цитоплазме выявлялись микропузырьки ЭПС.

Табл. 13.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P70) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в постпубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P70	E0-P70	P0-P70
Площадь кортикостероцита, мкм^2	58,91 $\pm$ 1,42#	70,77 $\pm$ 1,87*#	51,62 $\pm$ 0,72*#◆
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм^2	21,60 $\pm$ 0,29	22,93 $\pm$ 0,47*#	19,56 $\pm$ 0,42*#◆
Диаметр митохондрий, мкм	1,32 $\pm$ 0,04#	1,34 $\pm$ 0,03	1,26 $\pm$ 0,03#
Количество митохондрий в мкм^2 цитоплазмы	0,52 $\pm$ 0,02#	0,53 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,04#
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	97,25 $\pm$ 3,24	95,35 $\pm$ 4,55	86,05 $\pm$ 2,15*◆
Доля площади липидных включений в цитоплазме, %	3,11 $\pm$ 0,12#	4,17 $\pm$ 0,24*#	4,13 $\pm$ 0,20*#
Диаметр липидных включений, мкм	3,67 $\pm$ 0,18#	2,44 $\pm$ 0,05*#	1,15 $\pm$ 0,12*◆#

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ◆ – отличия группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70, # – от предыдущего срока исследования.

У крыс группы ДДТ E0-P70 размеры кортикостероцитов сетчатой зоны и размеры их ядер уменьшились по сравнению с предыдущим сроком исследования, но превышали контрольные значения (табл. 13). Ядра имели неправильную форму (рис. 80). Ядрышко располагалось центрально. Количество митохондрий в 1мкм^2 цитоплазмы и их размеры не изменились по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовали значениям контрольной группы (табл. 13). Митохондрии имели везикулярные кристы и, как правило,

просветленный матрикс (рис. 81). Содержание липидных включений в цитоплазме уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования и превышало контрольные значения (табл. 13). По сравнению с контрольной группой размеры липидных капель были меньше (табл. 13), их электронная плотность также была повышена (рис. 80). ЭПС была хорошо развита (рис. 81). В парануклеарной области часто наблюдался комплекс Гольджи.

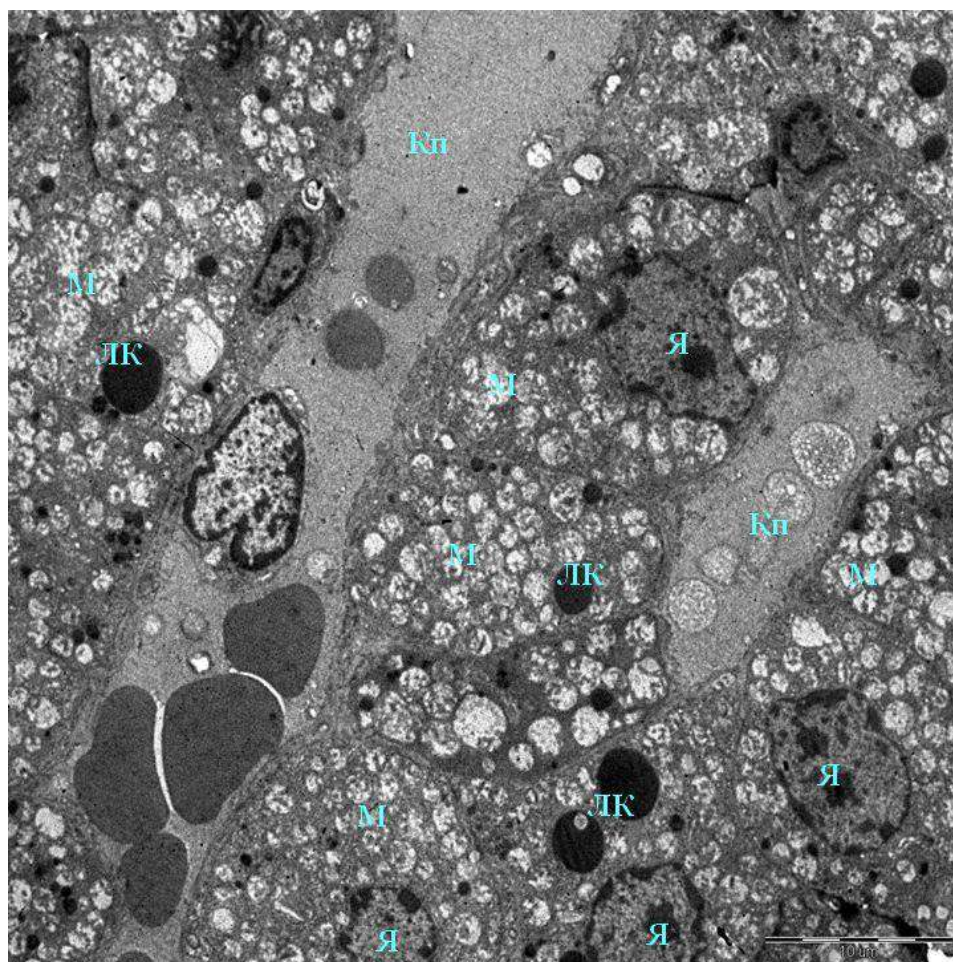


Рис. 79. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития.

Кортикостероциты формируют тяжи, разделенные капиллярами (Кп). Ядра (Я) неправильной формы с центрально расположенным ядрышком. Высокое содержание митохондрий (М) в цитоплазме. Выраженный отек матрикса митохондрий. Низкое содержание липидных капель (ЛК) в цитоплазме.

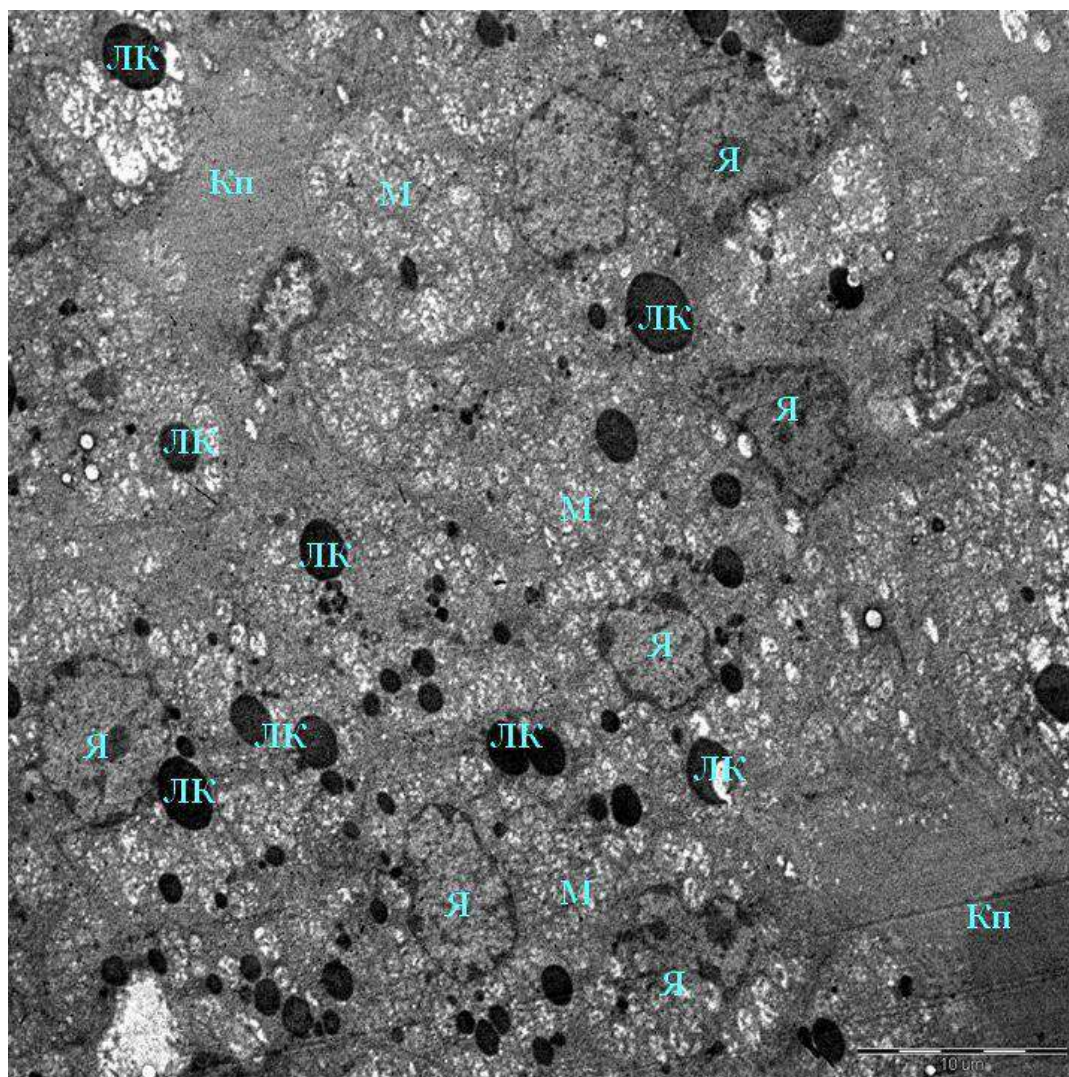


Рис. 80. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ Е0-Р70).

Кортикостероциты разделены капиллярами (Кп). Ядра (Я) неправильной формы с выраженным преобладанием эухроматина. В цитоплазме большое количество митохондрий (М) небольшого размера. Отек матрикса митохондрий выражен меньше, чем в контроле. Содержание липидных капель (ЛК) повышено.

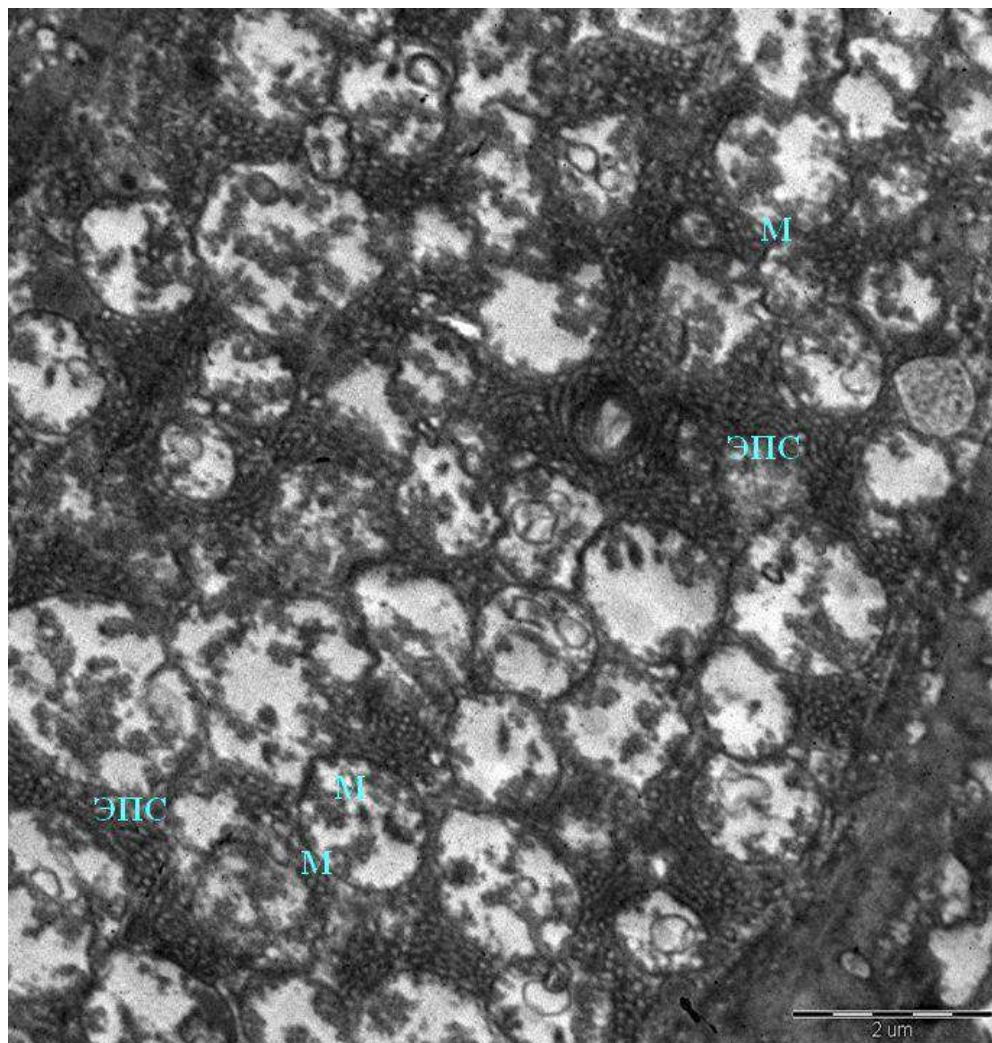


Рис. 81. Ультраструктура кортикостероцита сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки (ДДТ E0-P70).

Митохондрии (М) с везикулярными кристами и отеком матрикса. В цитоплазме хорошо выражена ЭПС.

У крыс группы ДДТ P0-P70 наблюдались значительные изменения ультраструктуры кортикостероцитов сетчатой зоны по сравнению с предыдущим сроком исследования. Отмечалось уменьшение размеров клеток и размеров ядер (табл. 13). Ядра имели неровные контуры. Эухроматин преобладал над гетерохроматином. Этим они отличались от контрольной группы и группы ДДТ E0-P70. Количество митохондрий в 1мкм^2 цитоплазмы увеличилось и не отличалось от контрольных значений (табл. 13). Диаметр митохондрий также уменьшился (табл. 13). В отличие от контрольной группы и группы ДДТ E0-P70 чаще встречались митохондрии с тубуло-везикулярными кристами (рис.

82). Как правило, матрикс митохондрий был резко просветлен (Табл. 13, рис. 82). ЭПС была представлена расширенными канальцами (рис. 82). Значительно уменьшилось содержание липидных включений в цитоплазме, но оно превышало значения контрольной группы (табл. 13). Размеры липидных капель также уменьшились и были наименьшими в сравниваемых группах (табл. 13). Липидные капли характеризовались повышенной осмиофильностью.

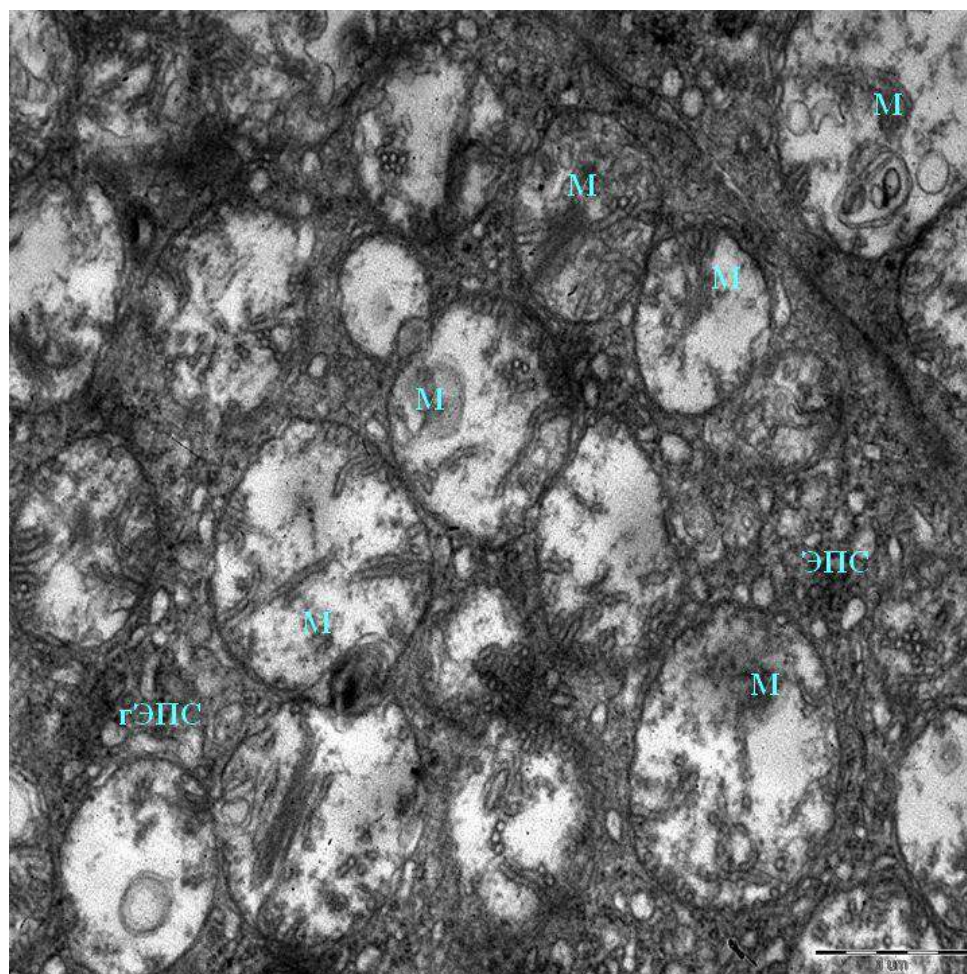


Рис. 82. Ультраструктура кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечника крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ на 70-ые сутки (ДДТ P0-P70).

Митохондрии (М) имеют тубулярные и везикулярные кристы. Канальцы ЭПС и гЭПС расширены.

Заключение. В контрольной группе после наступления половой зрелости кортикостероциты сетчатой зоны уменьшились в размерах. Выявлена структурная реорганизация митохондрий в виде увеличения численности и уменьшения размеров. Также в цитоплазме также стало меньше липидных

включений. У крыс группы ДДТ Е0-Р70 реорганизация митохондрий не наблюдалась. Содержание липидов было большим, чем в контроле. У крыс группы ДДТ Р0-Р70 возрастные изменения были аналогичны контрольным и имели большую степень выраженности.

3.4. ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ И ТОЛЬКО В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

3.4.1. Изменения продукции катехоламинов у крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У самцов крыс контрольной группы в пубертатном периоде концентрация норадреналина в плазме крови была незначительно выше, чем адреналина (рис. 83).

У самцов крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ E0-P42), концентрация адреналина была меньше в среднем на 20% (рис. 83а). Уменьшение концентрации норадреналина было более выраженным, в среднем на 45% (рис.83б).

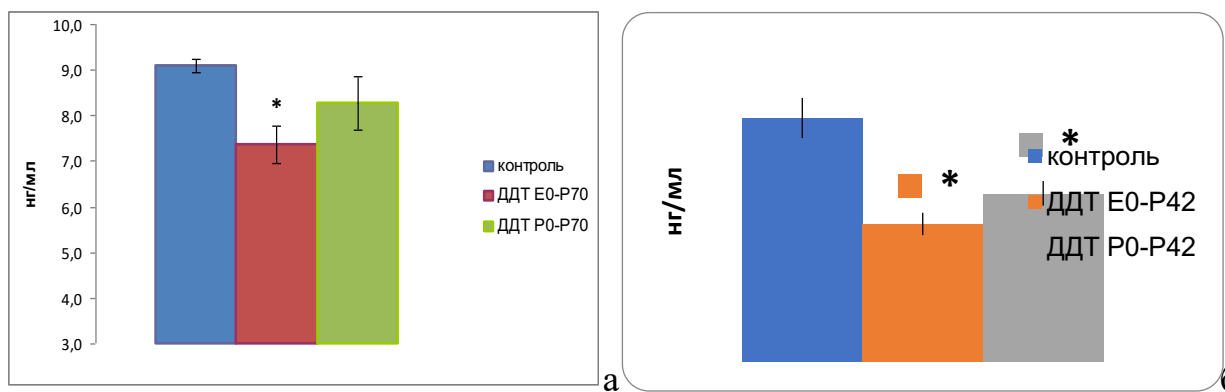


Рис. 83. Концентрация адреналина (а) и норадреналина (б) в плазме крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, а также только в постнатальном периоде онтогенеза и контрольных групп ($M \pm m$).

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы.

У самцов крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном развитии (ДДТ P0-P42), в период полового созревания также

отмечалось уменьшение содержания катехоламинов, но оно было менее выраженным. Концентрация адреналина была меньше менее чем на 10%, а норадреналина – на 30% по сравнению с контролем (рис. 83).

Заключение. У крыс группы ДДТ Е0-Р42 отмечалось уменьшение концентрации обоих катехоламинов с более выраженным снижением продукции норадреналина. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 наблюдались аналогичные изменения, но с меньшей степенью выраженности.

3.4.2. Ультраструктура хромаффинных клеток у крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы

У крыс контрольной группы пубертатного возраста в мозговом веществе основную часть хромаффинных клеток составляли адреналоциты. Норадреналоциты выявлялись реже. Они располагались группами. Встречались единичные малые гранулярные клетки, нейроны и шванновские клетки. Просветы капилляров были свободны или содержали эритроциты.

Адреналоциты представляли собой продолговатой формы клетки с крупными округлыми ядрами с ровными контурами. В ядрах преобладал эухроматин. Во многих ядрах наблюдалось 1-2 ядрышка. Цитоплазма клеток имела просветленный матрикс. Митохондрии располагались в основном в парануклеарной области, также встречались и субплазмолеммальное расположение митохондрий. Они имели удлиненную форму, септальные кристы и электронно-плотный матрикс (рис. 84, 85). Во многих клетках в парануклеарной области также выявлялся комплекс Гольджи, представленный канальцами и везикулами, а также канальцы гЭПС. В цитоплазме содержалось большое количество секреторных гранул (рис. 84, 85). Секреторные гранулы имели содержимое различной электронной плотности (рис. 84, 85). Многие секреторные гранулы имели просветление вокруг плотного ядра.

Норадреналocyтy по размерам не отличались от адреналocyтoв. Они также имели округлые ядра с ровными контурами и с высоким содержанием эухроматина. Ядрышко в норадреналocyтax встречалось реже. Митохондрии располагались в парануклеарной области (рис. 86). Они имели меньшие размеры, чем у адреналocyтoв (табл. 14). Их численность также была меньшей (табл. 14). В цитоплазме встречались каналцы гЭПС, выявлялся комплекс Гольджи. Количество секреторных гранул в цитоплазме было меньше, чем у адреналocyтoв (табл. 14). Они имели типичную “перстневидную” форму и состояли из электронноплотного ядра, располагавшегося эксцентрично, и оболочки (рис. 86). Размеры плотного ядра и его электронная плотность сильно варьировали, в некоторых секреторных гранулах содержимое было полностью растворено и сохранялась только оболочка гранулы.

Просветы капилляров содержали плазму или единичные эритроциты, реже в просветах встречались секреторные гранулы хромаффинных клеток (рис. 85).

У крыс группы ДДТ Е0-Р42 размеры хромаффинных клеток и их ядер были меньшими (рис. 87). Адреналocyтy имели типичную форму. Ядра округлые с четкими ровными контурами характеризовались высоким содержанием эухроматина (рис. 88, 89). Ядрышко располагалась центрально, реже было эктопировано. Митохондрии располагались парануклеарно (рис. 89). Их размеры и структура не отличались от таковых в контрольной группе, но отмечалось уменьшение численности митохондрий в клетках (табл. 14). Количество секреторных гранул в цитоплазме соответствовало контрольным значениям (табл. 14). В цитоплазме встречалась умеренно развитая гЭПС. В норадреналocyтax выявлено уменьшение размеров митохондрий (табл. 14, рис. 90). Содержание секреторных гранул было меньшим по сравнению с контролем (табл. 14, рис. 90).

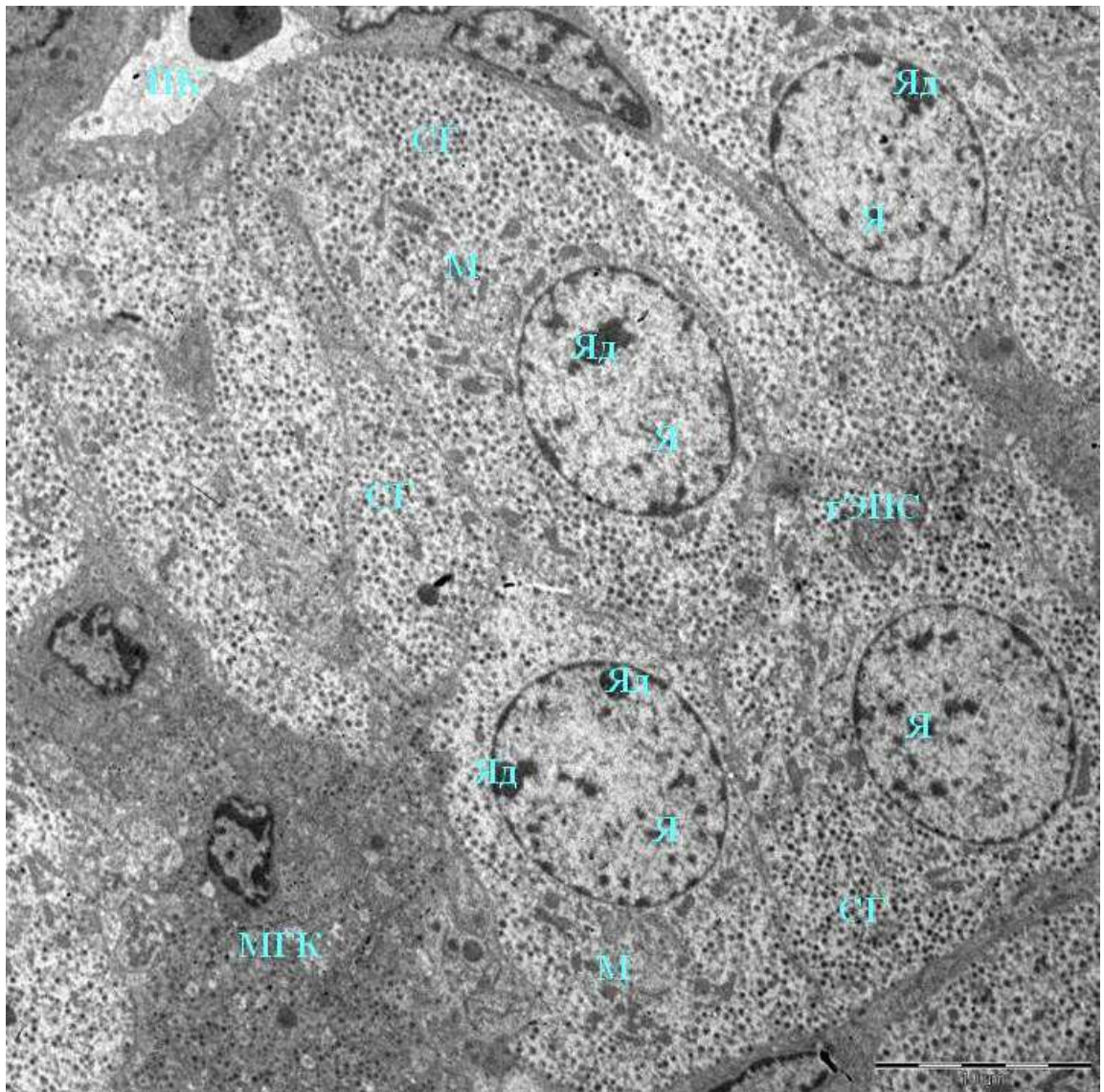


Рис. 84. Ультраструктура адреноцитов крыс контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Клетки полигональной формы с округлыми ядрами (Я) с высоким содержанием эухроматина. Ядра содержат 1-2 ядрышка (Яд). В парануклеарной области расположены митохондрии (М) продолговатой формы. В некоторых клетках встречаются митохондрии под плазматической мембраной. В отдельных клетках хорошо визуализируется гЭПС. В цитоплазме большое количество электронно-плотных секреторных гранул (СГ). Слева расположены малые гранулярные клетки (МГК) с небольшого размера ядрами неправильной формы и цитоплазмой умеренной электронной плотности, содержащей гранулы.

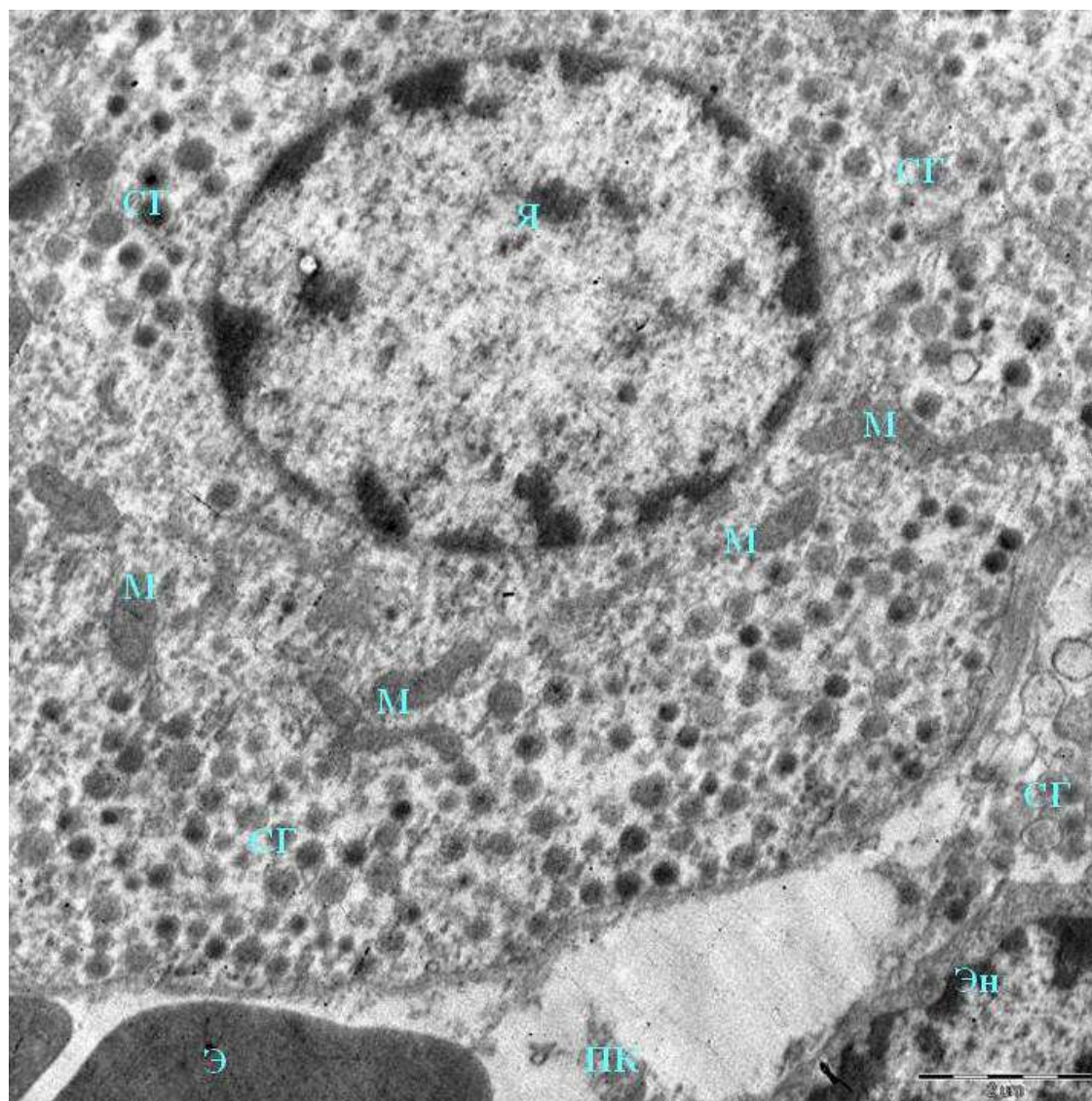


Рис. 85. Ультраструктура адреналоцита крыс контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Ядро (Я) овальной формы с высоким содержанием эухроматина. Митохондрии (М) продолговатой формы с матриксом умеренной электронной плотности и расположены парануклеарно. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ), большинство которых не имеет признаков оводнения. К адреналоциту прилежит капилляр. В просвете капилляра (ПК) видны эритроциты, над эндотелиоцитом (Эн) в просвете расположены выделившиеся секреторные гранулы (СГ).

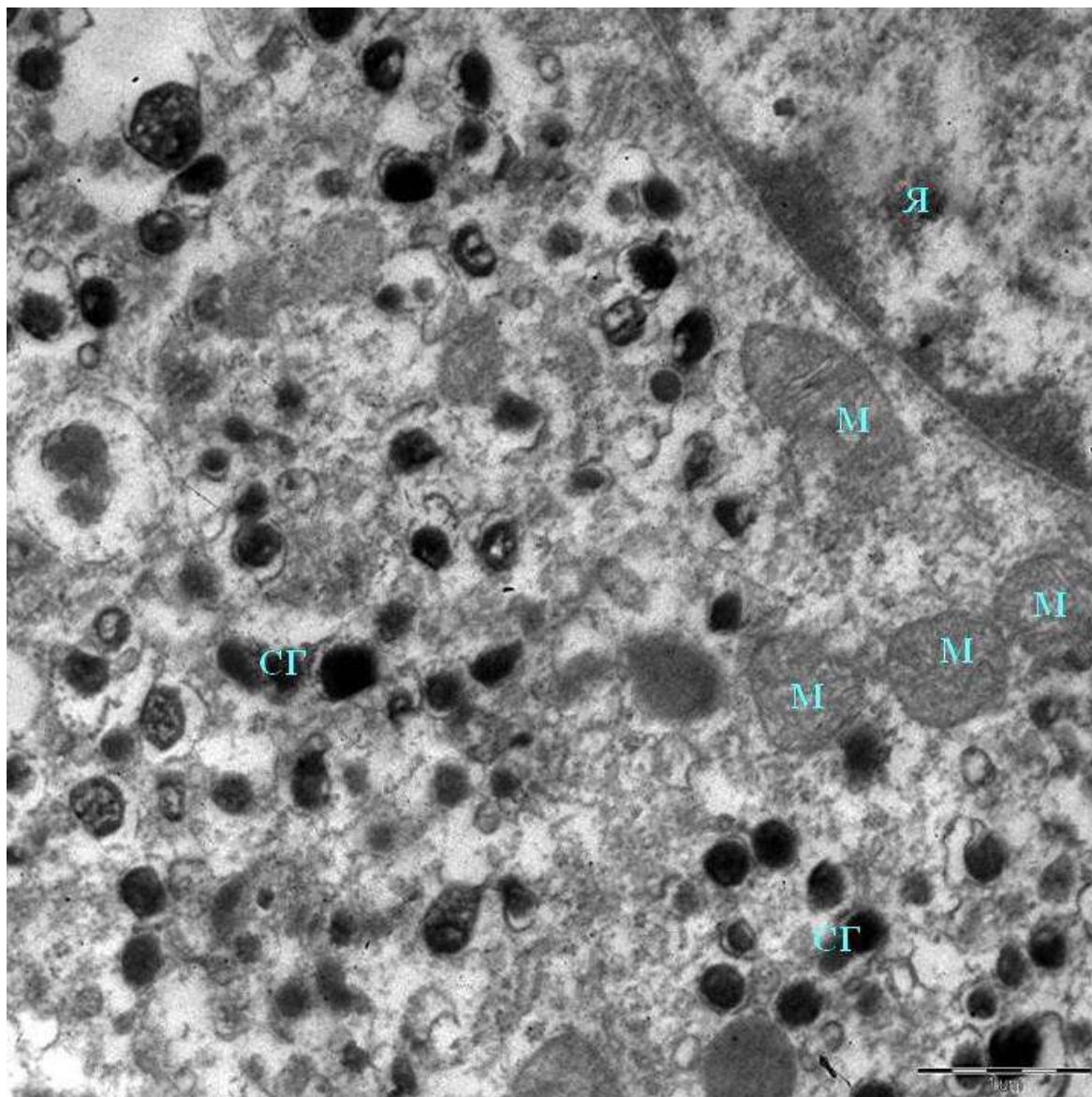


Рис. 86. Ультраструктура норадреналоцита крыс контрольной группы на 42-ые сутки постнатального развития.

Ядро (Я) с ровным контуром. В парануклеарной области расположены митохондрии (М) небольшого размера с электронно-плотным матриксом и септальными кристами. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ) различного размера с асимметрично расположенным резко осмиофильным ядром, окруженным просветленным ободком.

Табл. 14.

Ультраструктурные изменения хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P42) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в пубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P42	E0-P42	P0-P42
Адреналocyтy			
Продольный размер митохондрий, мкм	1,02±0,07	1,11±0,07	1,63±0,10*♦
Поперечный размер митохондрий, мкм	0,52±0,02	0,47±0,02	1,16±0,08*♦
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,23±0,02	0,14±0,01*	0,17±0,2*
Количество секреторных гранул в мкм ² цитоплазмы	3,32±0,23	3,69±0,28	2,06±0,18*♦
Норадреналocyтy			
Продольный размер митохондрий, мкм	0,82±0,05	0,73±0,06	1,27±0,07*♦
Поперечный размер митохондрий, мкм	0,59±0,02	0,39±0,03*	0,73±0,04*♦
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,13±0,01	0,10±0,01	0,08±0,07*
Количество секреторных гранул в мкм ² цитоплазмы	1,60±0,07	1,37±0,07*	0,7±0,06*♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

У крыс группы ДДТ P0-P42 размеры хромаффинных клеток и их ядер были больше, чем в группе ДДТ E0-P42, но размер ядер не достигал контрольного уровня.

ных значений (рис. 87). Ядра имели овальную форму и четкий контур. В структуре ядра значительно превалировал эухроматин (рис. 91, 92). У адреналоцитов отмечались выраженные изменения в структуре митохондрий. Митохондрии были значительно увеличены в размерах (табл. 14), характеризовались отеком матрикса и деструкцией крист (рис. 91, 92). Количество митохондрий в клетках было уменьшено по сравнению с контролем (табл. 14). Также было значительно уменьшено содержание секреторных гранул (табл. 14, рис. 92). Хорошо была выражена гЭПС, в парануклеарной области встречался комплекс Гольджи. В норадреналоцитах наблюдались аналогичные изменения, но уменьшение числа митохондрий и секреторных гранул было более выраженным (табл. 14, рис. 93).

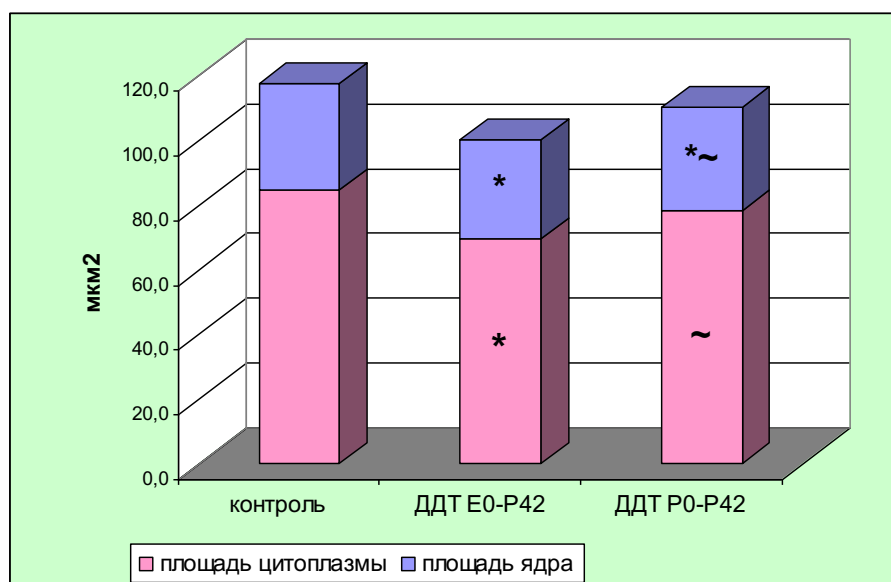


Рис. 87. Поверхностные размеры цитоплазмы и ядра хромаффинных клеток надпочечников крыс пубертатного возраста контрольной группы и подвергавшихся воздействию ДДТ в различные периоды развития.

Примечания: статистически значимые отличия от: * – контрольной группы, ~ – группы ДДТ P0-P42 от группы ДДТ E0-P42.

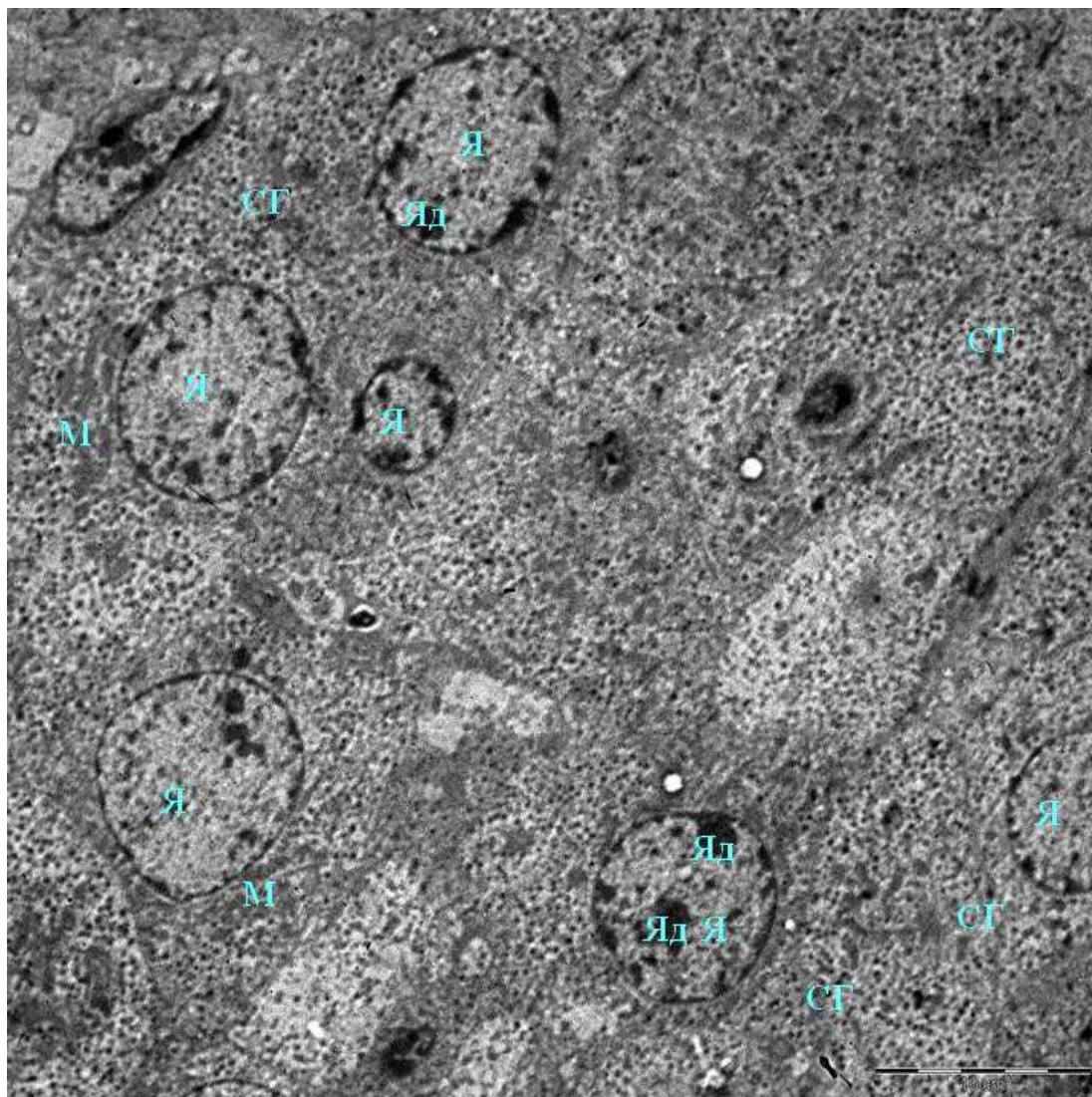


Рис. 88. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P42).

Клетки полигональной формы с округлыми ядрами (Я) с высоким содержанием эухроматина. Встречаются клетки с двумя ядрышками (Яд). В парануклеарной области небольшое количество митохондрий (М) продолговатой формы. В цитоплазме большое количество электронно-плотных секреторных гранул (СГ).

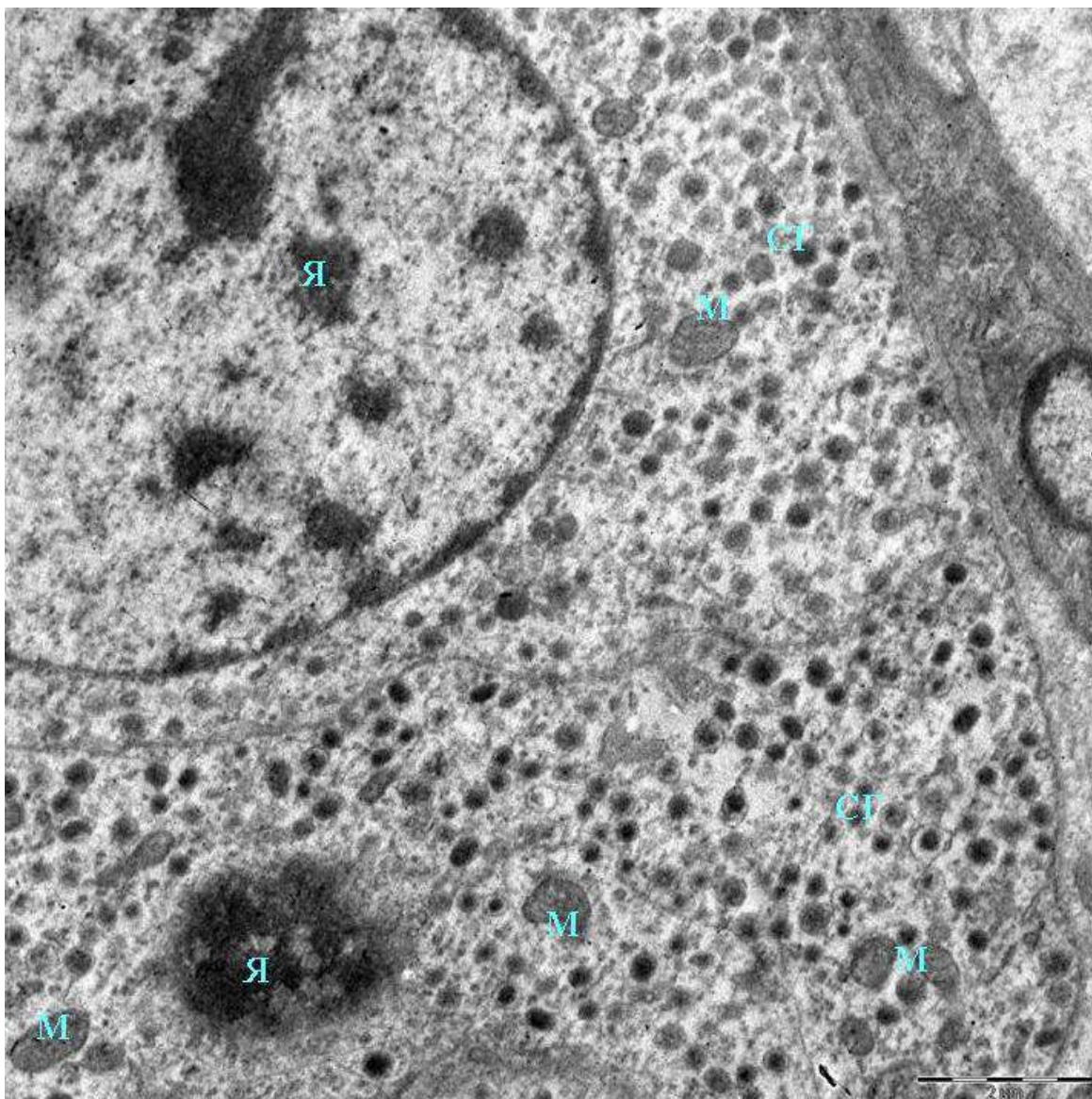


Рис. 89. Ультраструктура адреналокитов крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42).

Округлое ядро (Я) с ровным контуром и высоким содержанием эухроматина. Митохондрии (М) небольшого размера с электронно-плотным матриксом. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ) с резко осмиофильным ядром. Признаки оводнения содержимого секреторных гранул встречаются редко.

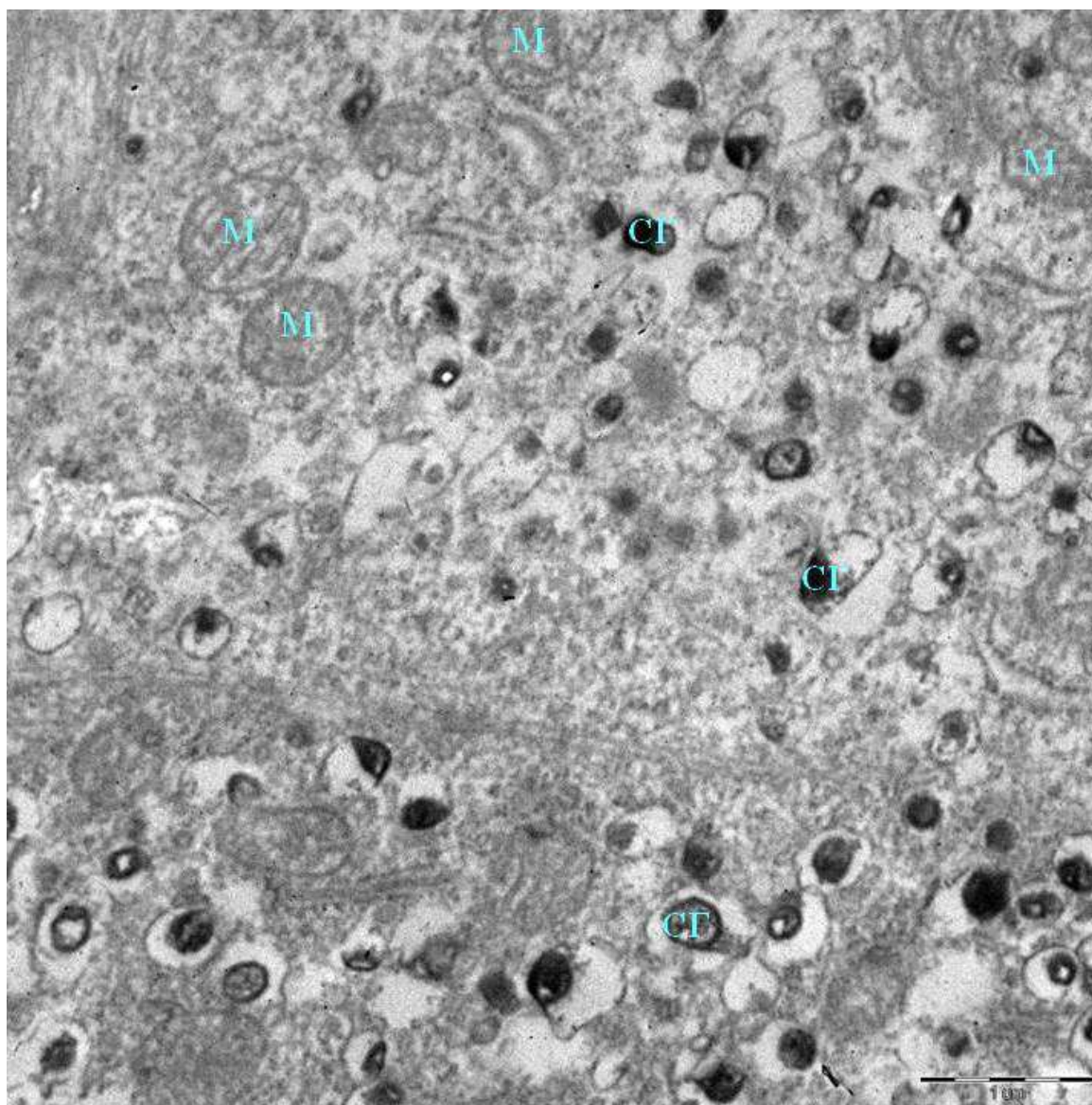


Рис. 90. Ультраструктура норадреналокитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р42).

В цитоплазме небольшое количество митохондрий (М) овальной формы с электронно-плотным матриксом и секреторных гранул (СГ). У многих секреторных гранул наблюдается обводнение содержимого вплоть до полного растворения.

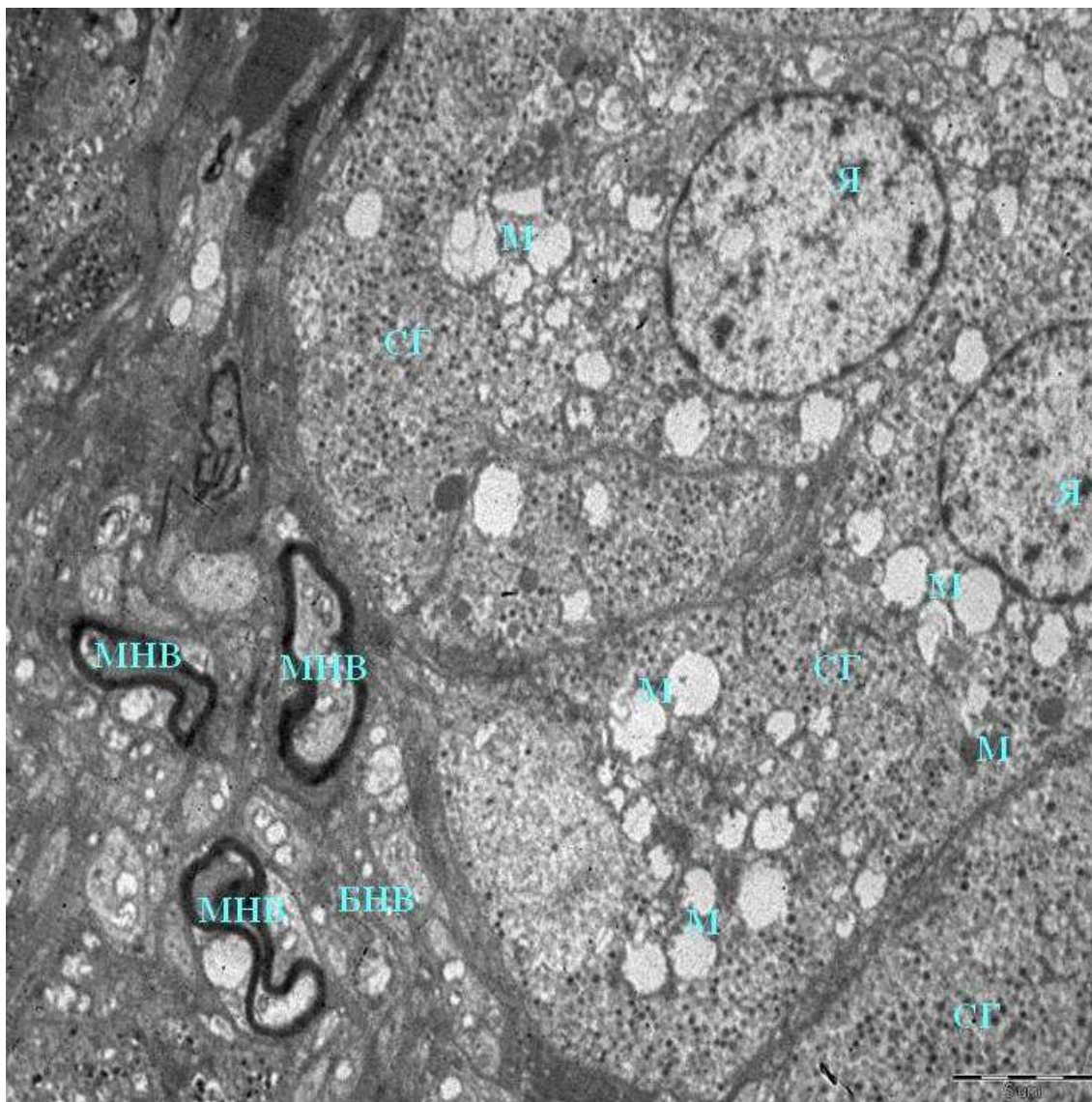


Рис. 91. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р42).

У адреноцитов ядра (Я) округлой формы с преобладанием эухроматина. В цитоплазме умеренное количество секреторных гранул (СГ) высокой электронной плотности. Митохондрии (М) значительно увеличены в размерах, матрикс митохондрий резко просветлен.

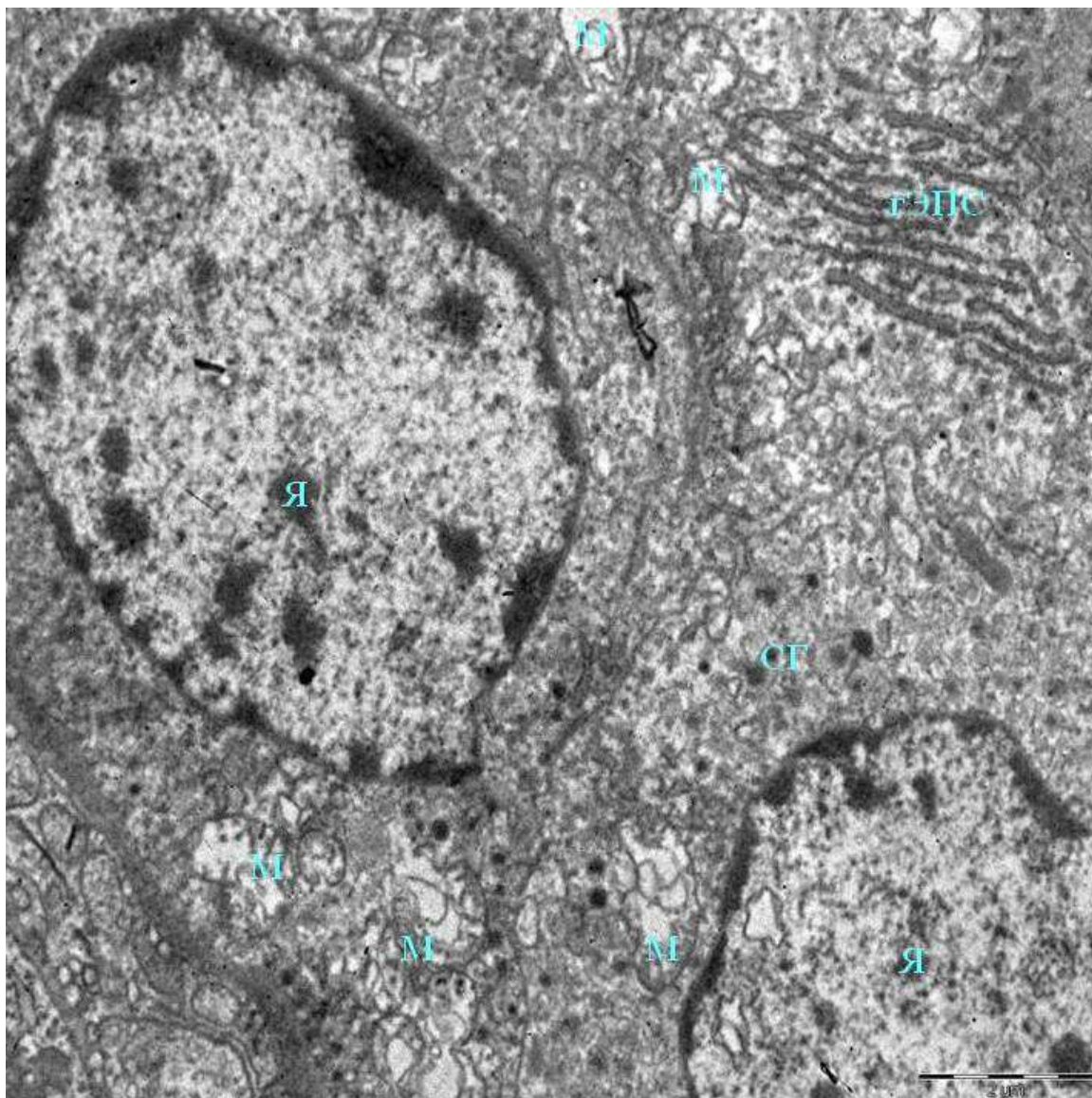


Рис. 92. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р42).

Адреноциты содержат ядра (Я) с неровными контурами. В цитоплазме канальцы гЭПС содержимым повышенной электронной плотности. Митохондрии (М) с отеком матрикса и деструкцией крист. Количество секреторных гранул (СГ) в цитоплазме невелико.

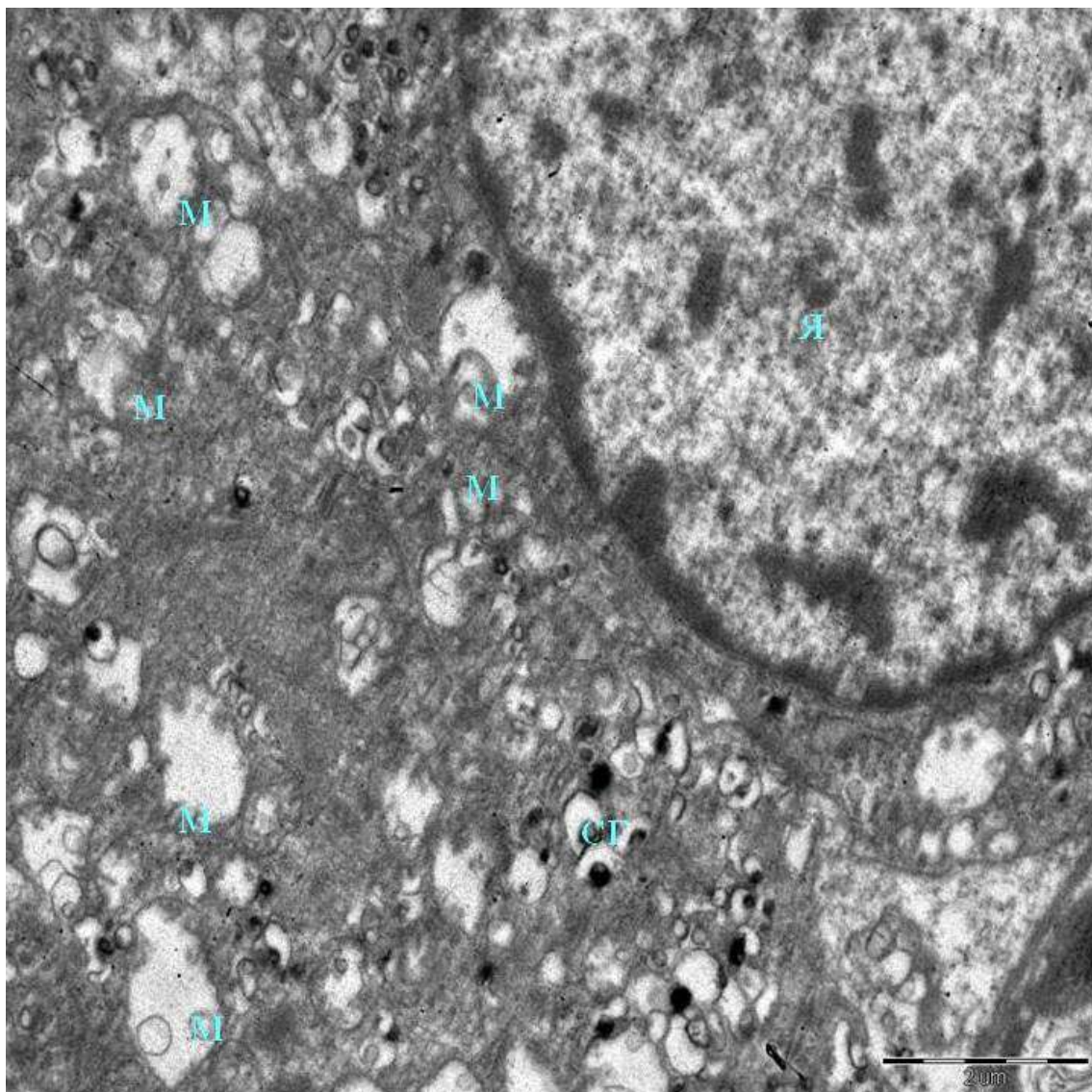


Рис. 93. Ультраструктура норадреналокитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 42-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р42).

Ядро (Я) имеет небольшие инвагинации, в цитоплазме единичные секреторные гранулы (СГ) с признаками растворения содержимого и увеличенные в размерах митохондрии (М) с выраженным отеком матрикса и деструкцией крист. Матрикс цитоплазмы имеет повышенную электронную плотность.

Закключение. У крыс группы ДДТ Е0-Р42 выявлены уменьшение содержания митохондрий в адреналоцитах и уменьшение размеров митохондрий в норадреналоцитах. У крыс группы ДДТ Р0-Р42 наблюдались выраженные изменения ультраструктуры клеток, заключающиеся в деструктивных изменениях в митохондриях и уменьшении их численности, а также в снижении числа секреторных гранул. Выявленные изменения наиболее были выражены в норадреналоцитах.

3.4.3. Изменения продукции катехоламинов у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы постпубертатного возраста

После наступления полового созревания у крыс контрольной группы отмечалось снижение концентрации адреналина в плазме в среднем на 20%. Уровень норадреналина статистически значимо не изменялся (рис. 94).

У половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периодах онтогенеза, содержание адреналина в плазме крови уменьшилось на 30% и было статистически значимо меньшим, чем у животных контрольной группы (рис. 94). Концентрация норадреналина после наступления половой зрелости снизилась на 35%, и была меньше значений контрольной группы на 60% (рис. 94).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде, после наступления половой зрелости выявлено значительное (более чем на 60%) снижение содержания адреналина и норадреналина в плазме крови (рис. 94). Содержание адреналина, а также норадреналина в плазме было наименьшим в исследуемых группах. Так же как и в предыдущем сроке исследования отмечалось более выраженное уменьшение концентрации норадреналина (в среднем на 76%).

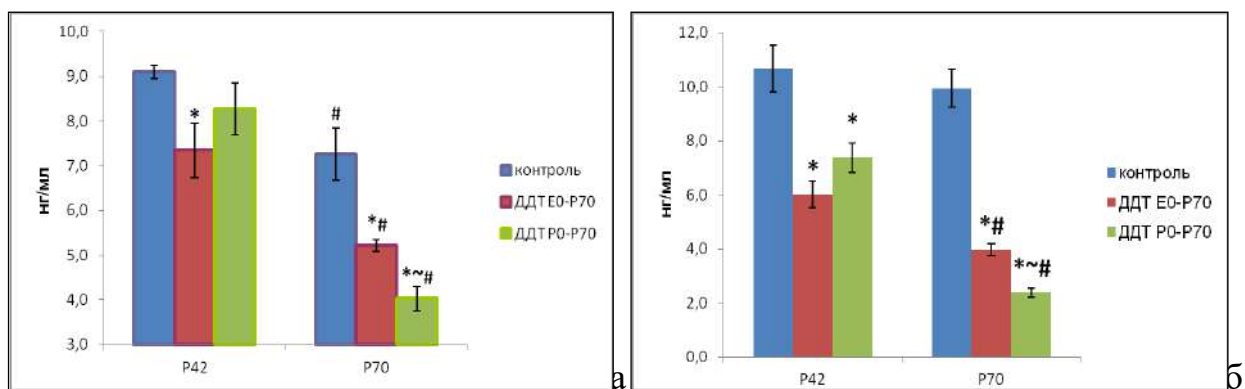


Рис. 94. Возрастные изменения концентрации адреналина (а) и норадреналина (б) в плазме у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, с 42-ых по 70-ые сутки постнатального развития.

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ~ – отличия группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70, # – от предыдущего срока исследования.

3.4.4. Ультраструктура хромаффинных клеток у крыс постпубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза, и крыс контрольной группы

Ультраструктура хромаффинных клеток крыс контрольной группы после достижения половой зрелости претерпела ряд существенных изменений. Выявлены уменьшение размеров клеток без изменения размеров ядер (рис. 95). Адреналоциты имели типичную форму. Ядро располагалось центрально. У многих клеток ядра имели неровные контуры. Отмечалось значительное преобладание эухроматина в ядре. Гетерохроматин располагался в виде тяжей вдоль внутренней ядерной мембраны и конденсированных глыбок в центральной части ядра. Перинуклеарное пространство было расширено по сравнению с предыдущим сроком. Часто наблюдалась эктопия ядрышка. Митохондрии располагались преимущественно парануклеарно. Их размеры были значительно больше, чем в пубертатном периоде (табл. 15), что было связано с отеком матрикса, наблюдавшимся у многих митохондрий (рис. 96). Количество митохондрий в цитоплазме значительно уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 15). В цитоплазме парануклеарной области также

встречались каналцы гЭПС и комплекс Гольджи. Содержание секреторных гранул было невысоким. Они располагались кластерами. По сравнению с предыдущим сроком исследования выявлены изменения в структуре секреторных гранул: визуальное увеличение размеров гранул, значительное уменьшение осмиофильности плотного ядра, его диспергирование и частичное или полное отсутствие. Также в цитоплазме адреналокитов встречались опустошенные участки, не содержащие секреторных гранул и органелл, характеризующиеся резко пониженной электронной плотностью.

В норадреналокитах наблюдались схожие изменения ультраструктуры ядра и митохондрий. Отличием было сохранение высокого содержания секреторных гранул в цитоплазме (табл. 15) и высокой осмиофильности их плотного ядра (рис. 97).

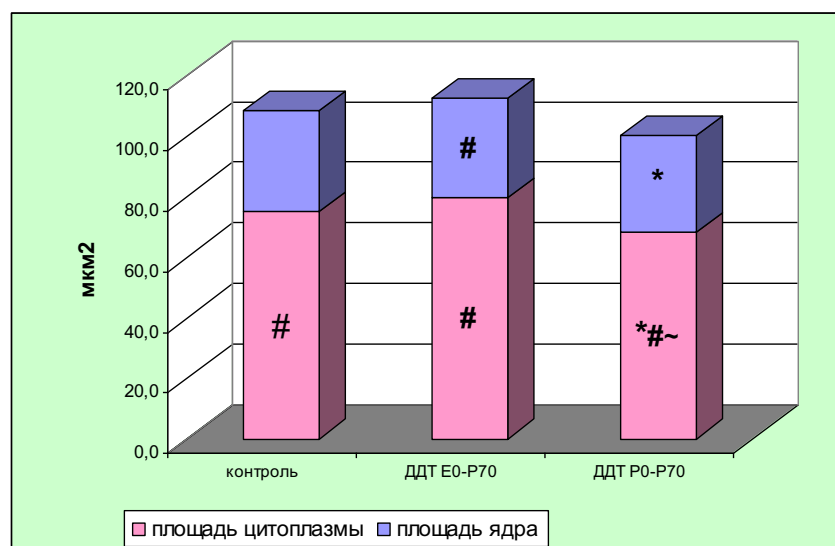


Рис. 95. Поверхностные размеры цитоплазмы и ядра хромаффинных клеток надпочечников крыс постпубертатного возраста контрольной группы и подвергавшихся воздействию ДДТ в различные периоды развития.

Примечания: статистически значимые отличия от: * – контрольной группы, ~ – группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70, # – от предыдущего срока исследования.

Табл. 15.

Ультраструктурные изменения хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс контрольной группы (P70) и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза в постпубертатном периоде ($M \pm m$)

Показатели \ Группы	Контрольная	ДДТ	
	P70	E0-P70	P0-P70
Адреналocyтy			
Продольный размер митохондрий, мкм	1,88±0,08#	1,63±0,06#	1,61±0,09
Поперечный размер митохондрий, мкм	1,15±0,07#	1,08±0,04#	0,98±0,06
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,07±0,004#	0,06±0,003#	0,08±0,005#
Количество секреторных гранул в мкм ² цитоплазмы	1,79±0,05#	0,74±0,03*#	2,33±0,11*♦
Норадреналocyтy			
Продольный размер митохондрий, мкм	1,28±0,07#	1,30±0,09#	1,14±0,05
Поперечный размер митохондрий, мкм	1,21±0,06#	1,0±0,06#	0,94±0,05*#
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,06±0,003#	0,07±0,004	0,15±0,008*#♦
Количество секреторных гранул в мкм ² цитоплазмы	1,69±0,09	0,82±0,04*#	2,40±0,10*#♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, # – от предыдущего срока исследования, ♦ – отличия группы ДДТ P0-P70 от группы ДДТ E0-P70.

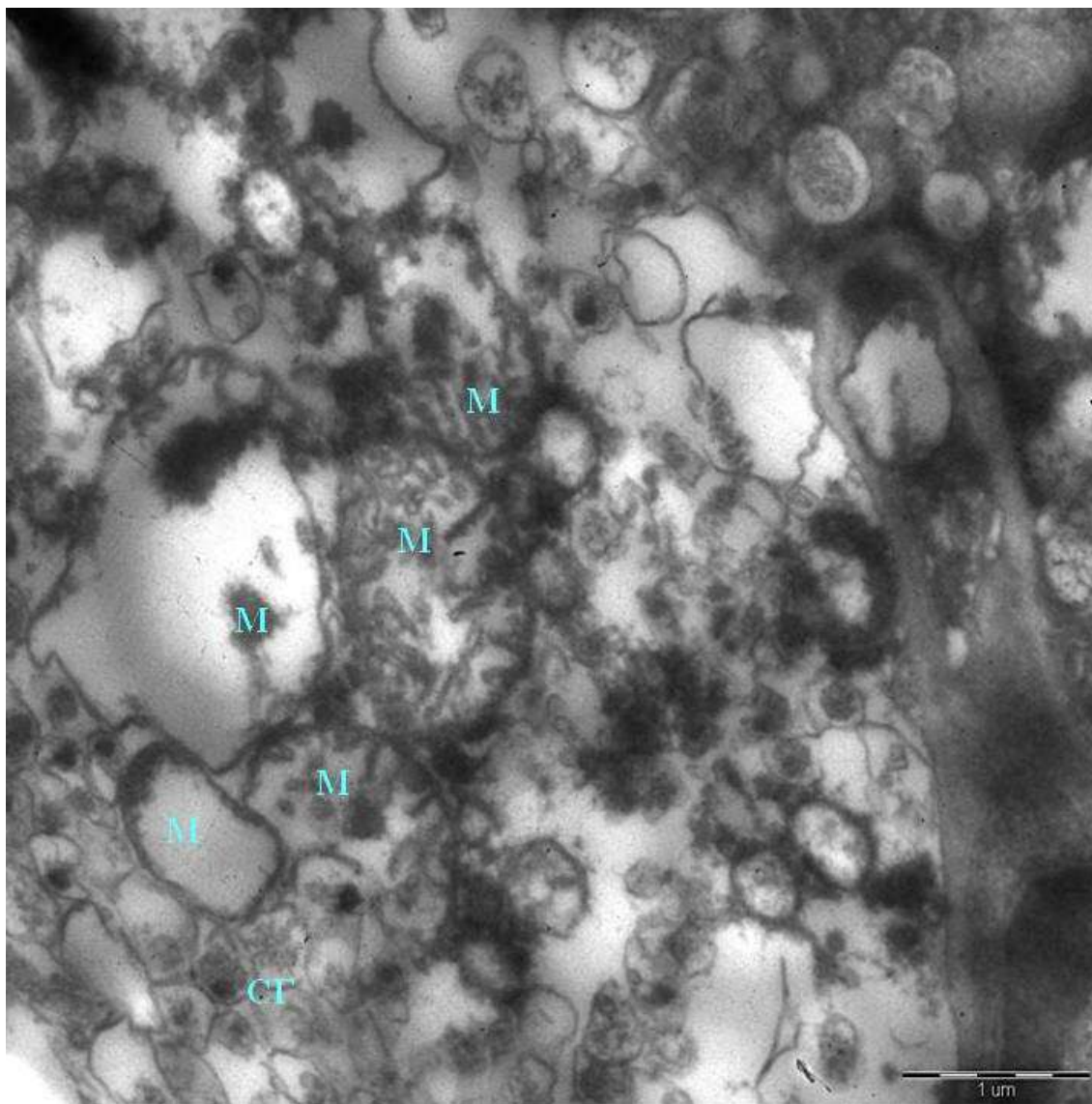


Рис. 96. Ультраструктура адреналокита крысы контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития.

В цитоплазме адреналокита расположены митохондрии (М) с различной степенью отека матрикса и деструкции крист. В секреторных гранулах (СТ) содержимое представляет собой рыхлые аморфные массы низкой электронной плотности. Встречаются опустошенные секреторные гранулы.

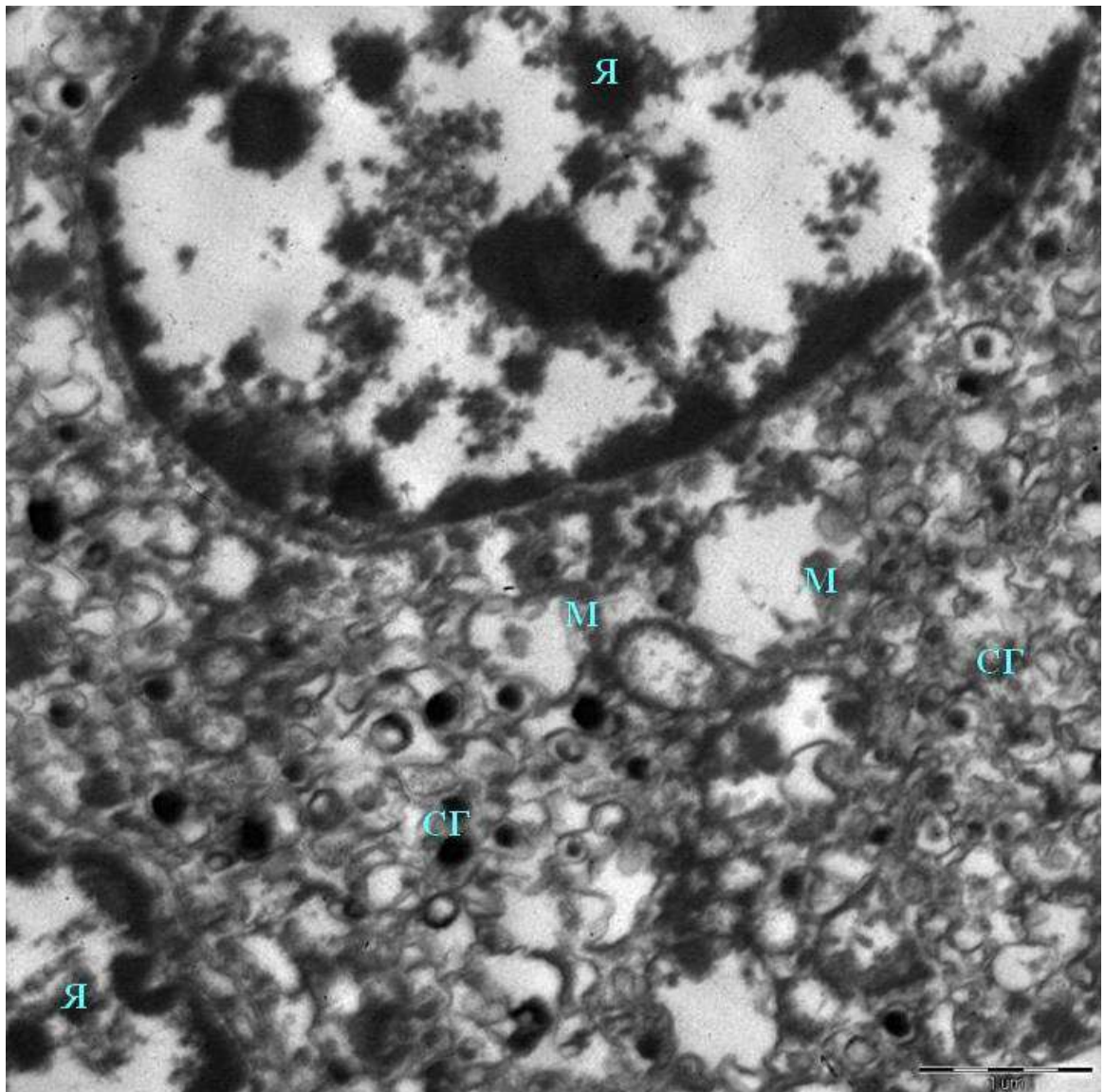


Рис. 97. Ультраструктура норадреналоцита крысы контрольной группы на 70-ые сутки постнатального развития.

В ядре (Я) гетерохроматин расположен вдоль внутренней ядерной мембраны и небольшими глыбками в центральной части ядра. Митохондрии (М) увеличены в размерах, их матрикс резко просветлен. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ) с резко осмиофильным содержимым.

В группе крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периоде, отмечалось увеличение размеров цитоплазмы и ядер хромаффинных клеток по сравнению с предыдущим сроком исследования в отличие от контрольной группы (рис. 95).

В адреналocyтaх ядpa имeли овaльную или нeпpaвильную фopмy. Гeтepoxpoмaтин pacпoлaгaлся в ocнoвнoм пoд внyтpeннeй ядepнoй мeмбpaнoй и oтдeльными плoтнo кoндeнсирoвaнными глyбкaми в цeнтpaльнoй чacти ядpa (рис. 98, 99). Чacтo oтмeчaлocь pacшиpeниe пepинyклeapнoгo пpocтpaнcтвa (рис. 99). Митoxoндpии в aдpeнaлoцитaх pacпoлaгaлись пpeимyщecтвeннo пa-paнyклeapнo. Пo cpaвнeнию c пpeдыдyщим cpoкoм иccлeдoвaния в cтpyктype митoxoндpий выaвлeны знaчитeльныe измeнeния. Митoxoндpии пpeдcтaвляли coбoй yвeличeнныe в paзмepax oбpaзoвaния c peзкo пpoсвeтлeнным мaтpикcoм и дecтpyкциeй кpист (рис. 98, 99). Знaчитeльнoe yвeличeниe пpoдoльныx и пoпepeчныx paзмepoв митoxoндpий пpивoдилo к yмeньшeнию их coдepжaния в 1 мкм^2 цитoплaзмы (тaбл. 15). В кeткaх yвeличилocь coдepжaниe пepвичныx лизocoм c coдepжимым yмepeннoй элeктpoннoй плoтнocти. Oтмeчaлcя кoнтaкт лизocoм c нaбyхшими митoxoндpиями (рис. 99). Кoличecтвo cекpeтopныx гpaнyл в цитoплaзмe былo пoчти в пять paз мeньшe, чeм y кpыc пyбepтaтнoгo вoзpaстa и в 2,5 paзa мeньшe, чeм y кpыc кoнтpoльнoй гpyппы aнaлoгичнoгo вoзpaстa (тaбл. 15). Сeкpeтopныe гpaнyлы xapaктepизoвaлись мeньшими paзмepaми, чeм y живoтныx кoнтpoльнoй гpyппы и бoлee выcoким coдepжaниeм cекpeтopнoгo пpoдyктa. У нeкoтopых aдpeнaлoцитoв oтмeчaлocь oпyстoшeниe кpупныx yчacткoв цитoплaзмы (рис. 99). Тaкжe в oтличиe oт кoнтpoльныx живoтныx нaблюдaлись нapyшeниe цeлocтнocти cтeнки кaпилляpoв и плaзмoлeммы xpoмaффинoцитoв, пoявлeниe в их цитoплaзмe эpитpoцитoв (рис. 98).

В нopaдpeнaлoцитaх cтpyктypa ядep былa aнaлoгичнoй aдpeнaлoцитaм. Тaкжe выaвлeны cxoжиe измeнeния в cтpyктype митoxoндpий, cвязaнныe c oтeкoм мaтpикca и дecтpyкциeй кpист (рис. 100). В oтличиe oт кoнтpoльныx живoтныx выaвлeнo yмeньшeниe coдepжaния cекpeтopныx гpaнyл пo cpaвнeнию c пpeдыдyщим cpoкoм иccлeдoвaния (тaбл. 15). Стpyктypa жe cекpeтopныx гpa-

нул принципиальных отличий не имела. Усиления формирования лизосом не наблюдалось.

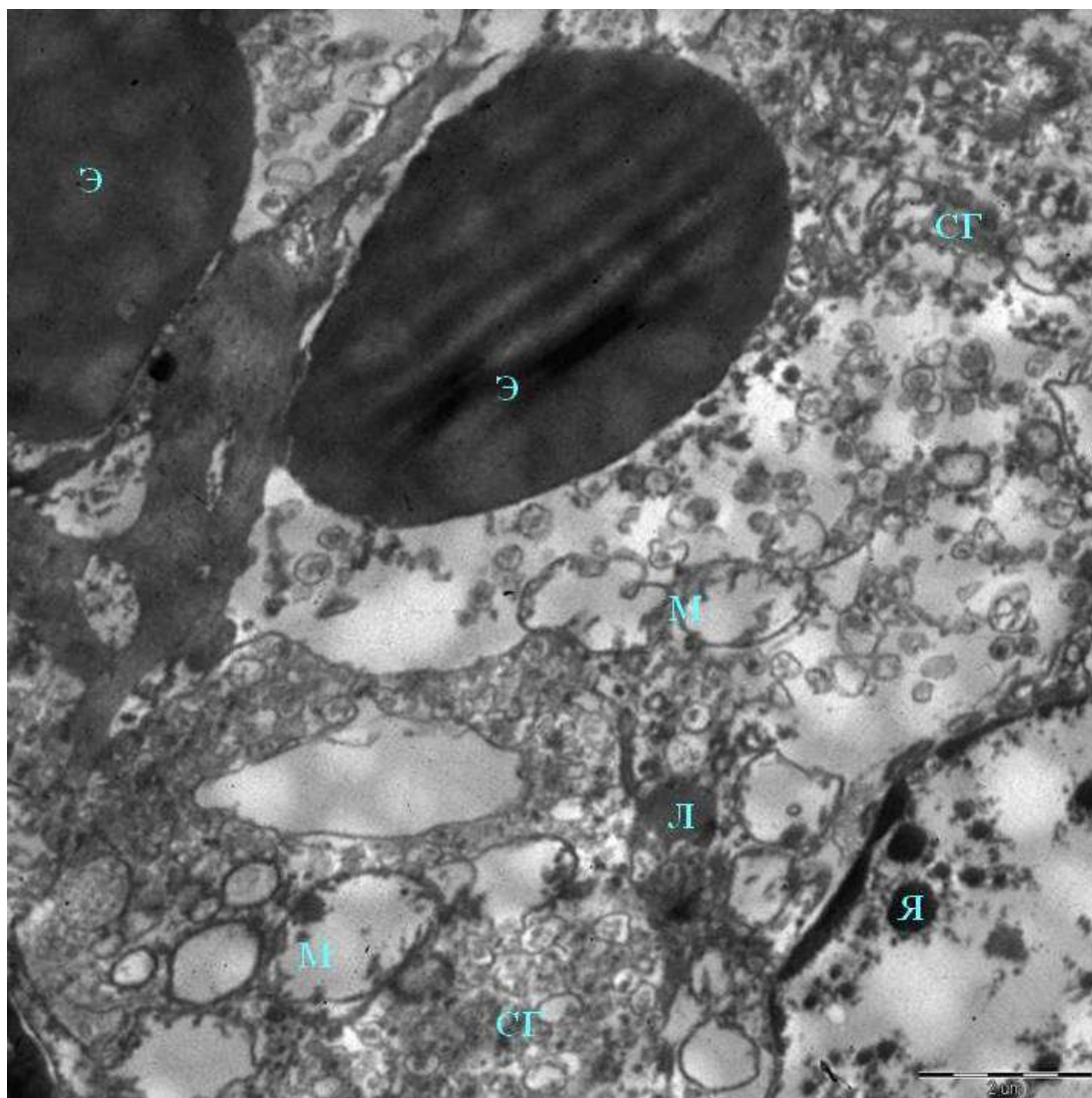


Рис. 98. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P70).

Ядро (Я) адреноцита с неровным контуром и значительным преобладанием эухроматина в структуре. В цитоплазме находятся митохондрии увеличенных размеров с резко просветленным матриксом и деструктивно измененными кристами, единичная лизосома (Л) и секреторные гранулы (СГ) с содержимым низкой электронной плотности, неравномерно распределенные в цитоплазме. Под мембранами адреноцитов находятся эритроциты (Э).

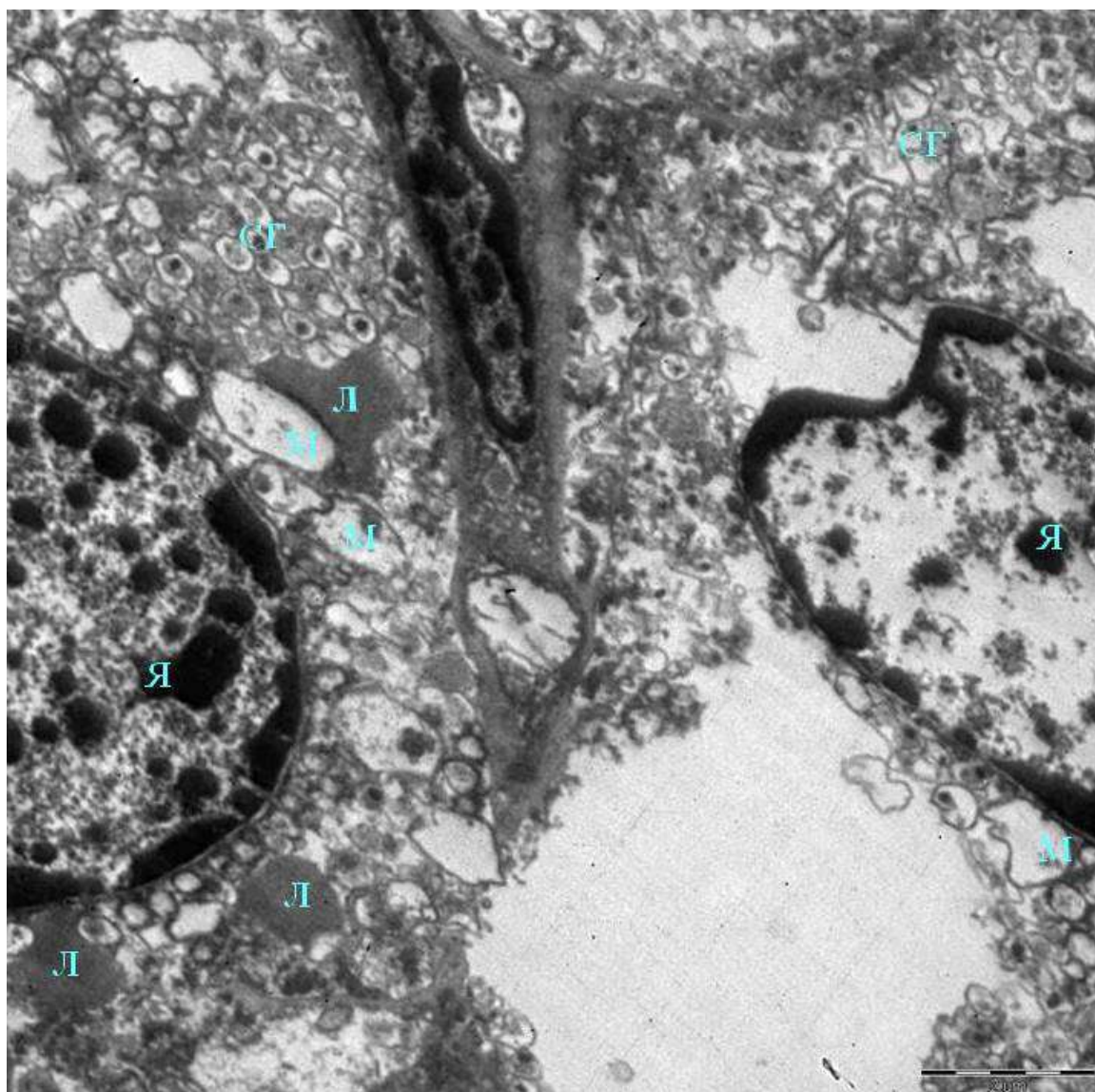


Рис. 99. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ Е0-Р70).

Слева – адреноцит с овальным ядром (Я) и высоким содержанием гетерохроматина. В парануклеарной области расположены митохондрии (М) с отеком матрикса и деструкцией крист, а также лизосомы (Л). Отмечается контакт лизосом с митохондриями. Секреторные гранулы (СГ) с содержимым умеренной электронной плотности компактно расположены в цитоплазме. Справа – адреноцит с преобладанием эухроматина в ядре (Я). Секреторные гранулы (СГ) расположены кластерами, в цитоплазме встречаются опустошенные участки.

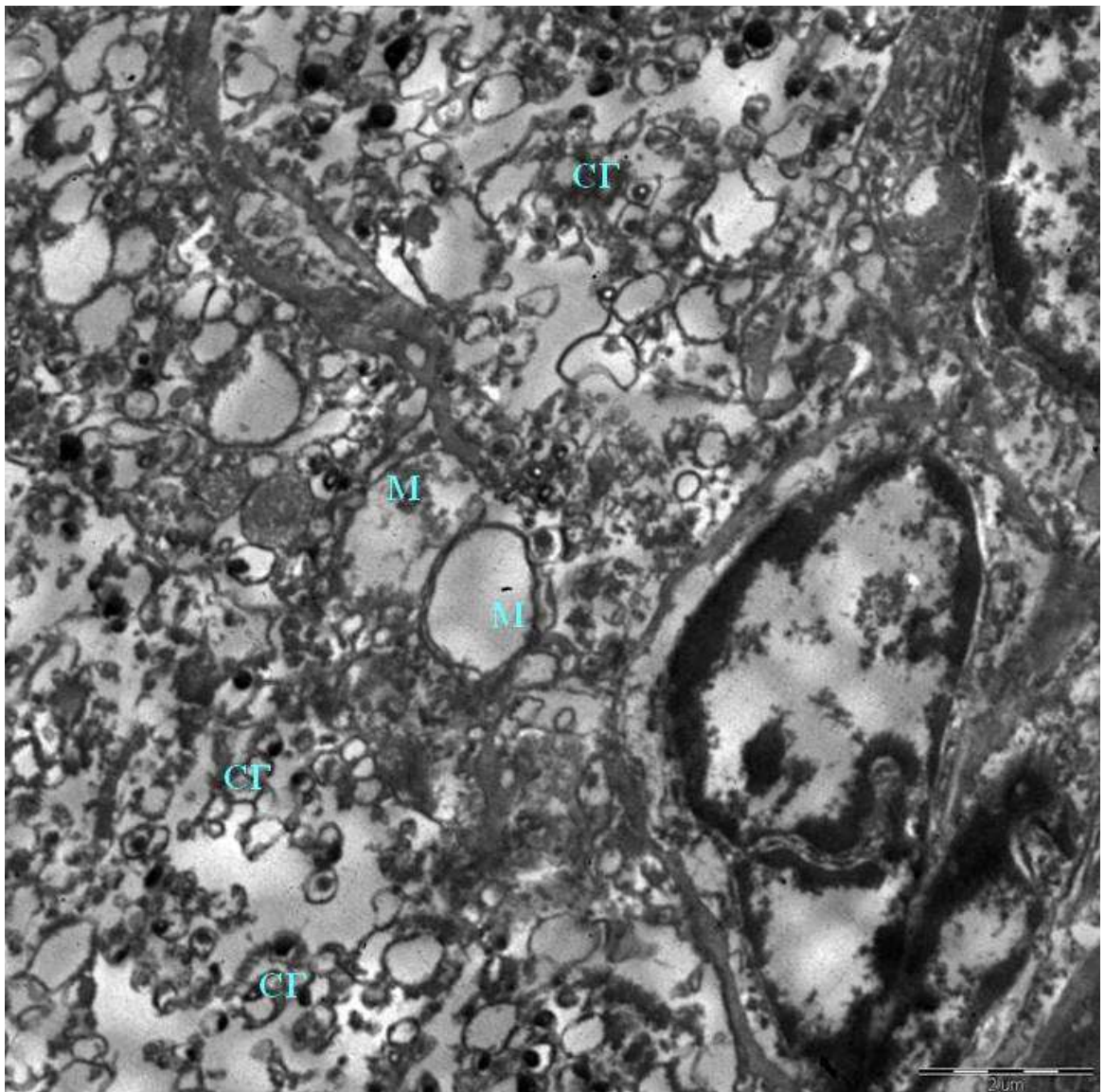


Рис. 100. Ультраструктура норадреналокитов крысы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ E0-P70).

Митохондрии (М) увеличены в размерах, матрикс резко просветлен, кристы деструктивно изменены. Содержание секреторных гранул в цитоплазме (СГ) понижено.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии, хромоафинные клетки уменьшились в размерах по сравнению с предыдущим сроком исследования и были наименьшими в сравниваемых группах

(рис. 95). Размер ядер не изменялся и был меньше, чем у крыс контрольной группы (рис. 95). Ядра адреналокитов имели овальную форму. Часто встречались ядра с инвагинациями ядерной оболочки и эктопией ядрышка. Содержание гетерохроматина в ядрах было крайне низким. Митохондрии располагались преимущественно парануклеарно. Встречались митохондрии как с отеком матрикса и деструкцией крист, так и без изменений структуры (рис. 101, 102). Содержание митохондрий в 1 мкм^2 цитоплазмы уменьшилось по сравнению в предыдущим сроком исследования и не отличалось от значений контрольной группы (табл. 15). В цитоплазме выявлялась хорошо развитая гЭПС (рис. 101, 102) и комплекс Гольджи. Секреторные гранулы диффузно располагались в цитоплазме. Их структура отличалась от таковой у контрольных животных и характеризовалась наличием осмиофильного плотного ядра и небольшим светлым ободком (рис. 101, 102). Количество секреторных гранул в цитоплазме не уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком и было более высоким, чем у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ (табл. 15).

Норадреналокиты также характеризовались ядрами с неровными контурами, низким содержанием гетерохроматина и эктопией ядрышка. Особенностью ультраструктуры норадреналокитов было более высокое содержание митохондрий и секреторных гранул в клетках (табл. 15). Митохондрии, как и в адреналокитах, характеризовались гетероморфностью. Некоторые митохондрии имели отек матрикса. Встречались митохондрии с деструкцией крист. Также выявлялись митохондрии без изменения структуры (рис. 103). Нередко наблюдалось скопление секреторных гранул вдоль ядерной оболочки клеток. В парануклеарной области выявлялись канальцы гЭПС и комплекс Гольджи (рис. 103).

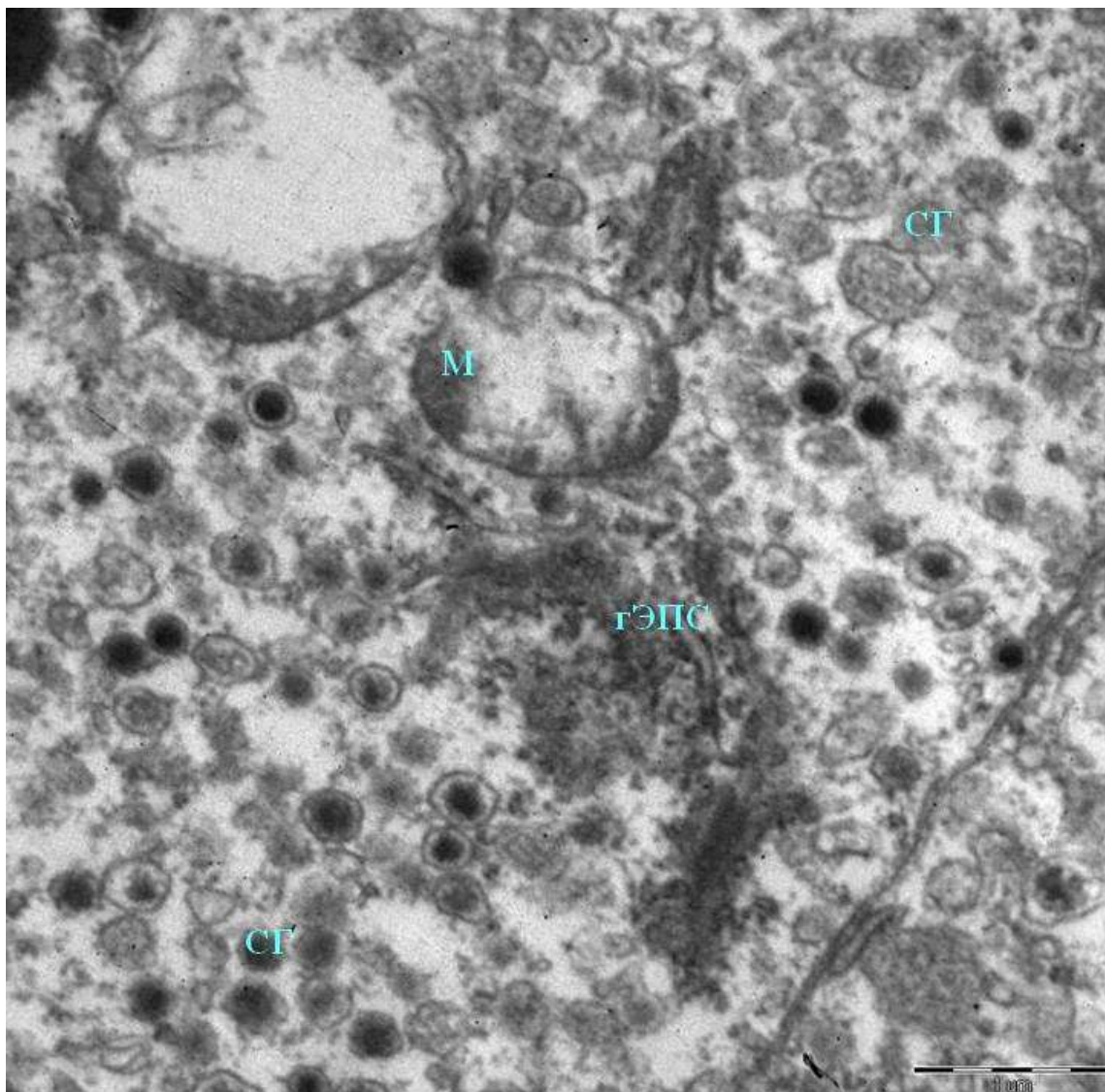


Рис. 101. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р70).

В цитоплазме адреноцита митохондрии (М) с разной степенью отека матрикса. Хорошо развита гЭПС. Высокое содержание секреторных гранул (СГ). Их содержимое имеет среднюю и высокую электронную плотность.

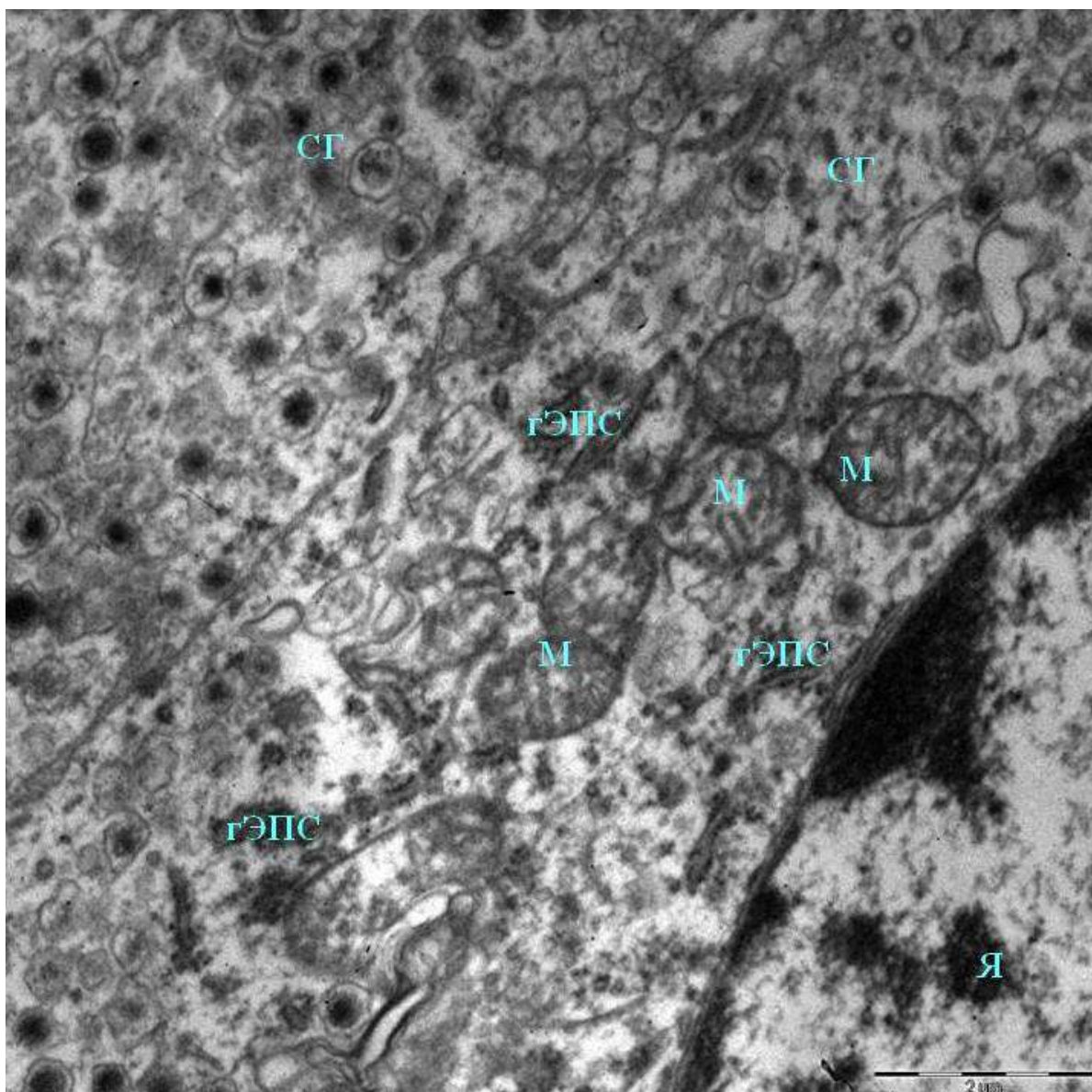


Рис. 102. Ультраструктура адреноцитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р70).

В парануклеарной области расположены группы митохондрий (М) небольшого размера овальной формы и каналцы гЭПС. Секреторные гранулы (СТ) с содержанием низкой, средней и высокой электронной плотности компактно расположены в цитоплазме.

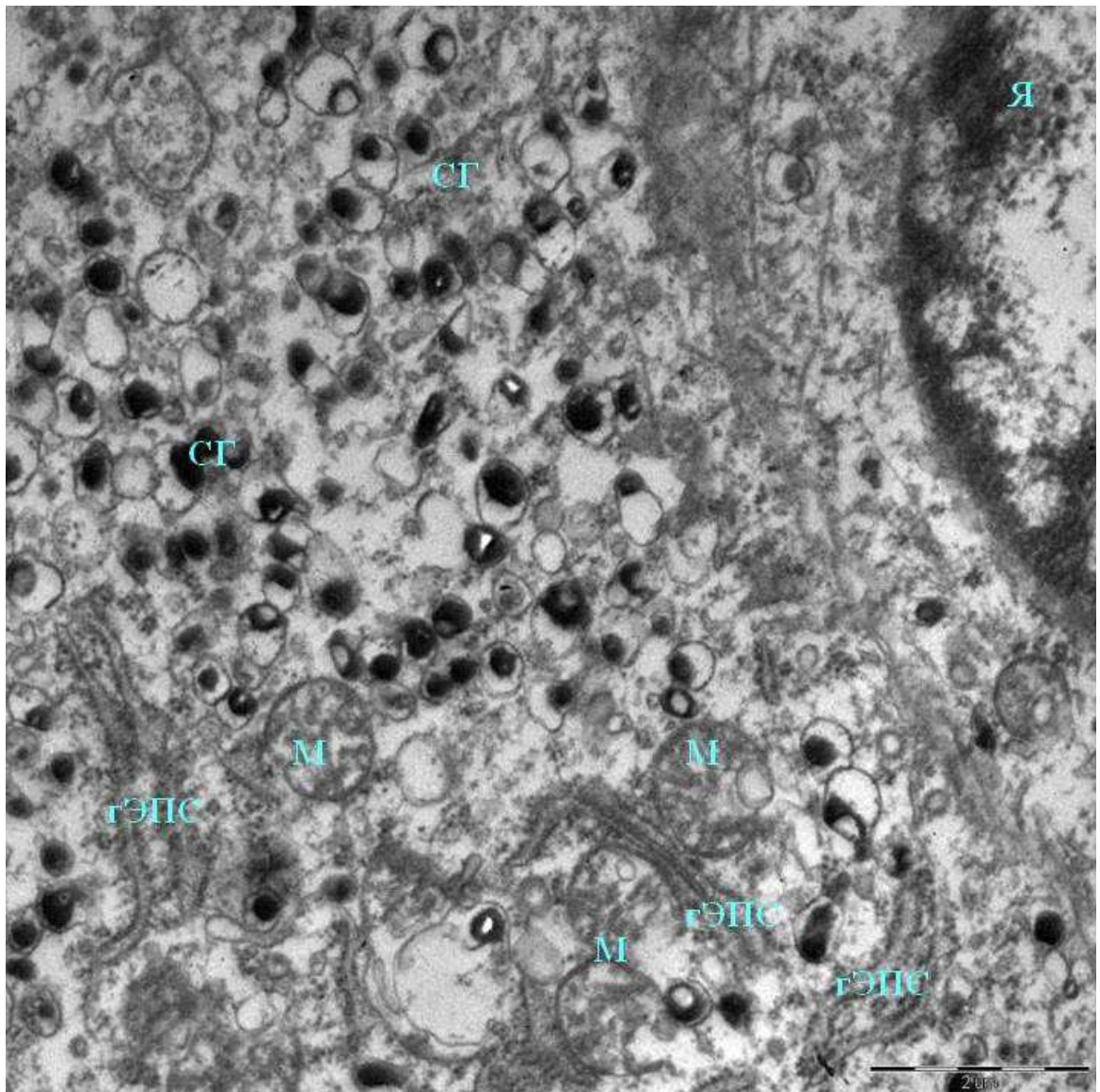


Рис. 103. Ультраструктура норадреналокитов крысы, подвергавшейся постнатальному воздействию ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития (ДДТ Р0-Р70).

В цитоплазме расположены многочисленные канальцы гЭПС и митохондрии (М) небольшого размера округлой формы. Высокое содержание секреторных гранул (СГ).

Заключение. У крыс контрольной группы в постпубертатном периоде отмечалось усиление функциональной нагрузки митохондрий, что приводило к отеку их матрикса, увеличению размеров и, соответственно, пропорциональному уменьшению их числа в 1мкм^2 цитоплазмы. Отмечались признаки обводнения

и растворения содержимого секреторных гранул и локального опустошения цитоплазмы в адреноцитах.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, выявлены схожие ультраструктурные изменения митохондрий и адреноцитов, и норадреноцитов. Аналогично уменьшалось содержание секреторных гранул по сравнению с предыдущим сроком исследования, но этот процесс был более выражен, чем у крыс контрольной группы. Обводнение секреторных гранул было меньшим. Отмечалось увеличение формирования первичных лизосом в адреноцитах. Выявлены признаки очаговых кровоизлияний.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде, выявлены признаки усиления синтетической активности и формирования секреторных гранул, но не их выделения. Отмечалось наличие большего числа неизмененных митохондрий и увеличение их содержания в норадреноцитах.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование выявило изменения морфогенетических процессов, как в корковом, так и мозговом веществе надпочечников, а также секреторной деятельности кортикостероцитов и хромаффинных клеток при развитии организма в условиях воздействия низких доз эндокринного дисраптора ДДТ. Это указывает на неселективность его действия на гистогенетически разнородные структуры надпочечника.

4.1. Изменения постнатального морфогенеза коркового вещества надпочечников

Меньшие размеры надпочечников у крыс опытных групп в пубертатном периоде были обусловлены отставанием в развитии в основном коркового вещества. Но у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора с первого пренатального развития, они были обусловлены уменьшением клубочковой и сетчатой зон, а при воздействии с первого дня постнатального развития – в основном сетчатой. Отличием этой группы является увеличение клеточной плотности сетчатой зоны. Это свидетельствует об отставании в развитии зоны и более поздней активации пролиферации. Известно, что кортикостероциты сетчатой зоны характеризуются высоким пролиферативным ответом на стимулы АКТГ [197]. Следовательно, уменьшение размеров сетчатой зоны – это изменение, вызванное дисрапторным действием в постнатальном периоде, так как увеличение числа клеток и повышение продукции половых стероидов доказывает нормальное реагирование кортикостероцитов на стимул АКТГ. У крыс, подвергшихся воздействию с начала пренатального развития, эти изменения отсутствуют, что свидетельствует о нарушении реакции клеток сетчатой зоны на митогенные стимулы АКТГ и сохранении реакции на стимулы, активирующие стероидогенез. Пониженная численность кортикостероцитов в сетчатой зоне указывают на торможение программы развития, в первую очередь пролиферации, и эти особенности обусловлены пренатальным действием дисраптора.

Меньшая площадь клубочковой зоны и уменьшение размеров ядер ее клеток в сочетании с повышением пролиферативной активности и расширением промежуточной зоны указывают на наличие нарушения развития этой зоны как в пренатальном периоде, так и на роль нарушений микроциркуляции в пубертатном периоде как на основные механизмы изменений клубочковой зоны у крыс, развивавшихся в условиях пре- и постнатального воздействия ДДТ. Выявленные изменения в развитии клубочковой зоны указывают на задержку активации сигнальных каскадов, отвечающих за формирование клубочковой зоны. Известно, что ведущая роль в формировании клубочковой зоны принадлежит каноническому Wnt-сигналингу [20]. Неравномерность толщины клубочковой зоны и даже ее фрагментарность указывают на нарушение его активации. Сравнение опытных групп доказывает, что именно пренатальное воздействие дисраптора вызывает нарушения развития клубочковой зоны.

Результаты исследования показывают, что пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ не оказывают существенного влияния на формирование пучковой зоны. Эти данные представляют значительный интерес, так как при введении токсичных доз ДДТ у грызунов отмечались дистрофические и некротические изменения именно в пучковой зоне и отсутствие изменений в клубочковой и сетчатой [36, 137, 153]. Следовательно, кортикостероциты пучковой зоны более чувствительны к токсическому действию ДДТ, а клубочковая и сетчатая – к дисрапторному. Морфологические и функциональные изменения в пучковой зоне, выявленные в пубертатном периоде, обусловлены нарушениями трофики и гибелью кортикостероцитов вследствие нарушения микроциркуляции и очаговых кровоизлияний. В научной литературе, посвященной воздействию высоких доз ДДТ на надпочечник, не встречаются сведения об изменениях гемодинамики в различных слоях коркового вещества. Результаты гистологического исследования в пубертатном периоде выявили изменения, наблюдаемые при перераспределении венозного оттока из мозгового вещества через корковое благодаря имеющимся анастомозам между их микроциркуляторными руслами [7, 11]. Известно, что такое перераспределение происходит при стрессо-

вых ситуациях, при дефиците адреналина, когда необходимо интенсифицировать транспорт катехоламинов в печень через систему воротной вены, а его морфологическими проявлениями являются расширение сосудов микроциркуляторного русла клубочковой и наружной части пучковой зоны, стазы эритроцитов, нарушения стенок капилляров [11]. Исследование содержания адреналина в системном кровотоке и секреторных процессов в хромаффинных клетках выявило снижение их функциональной активности, как в пубертатном, так и постпубертатном периодах. У крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, мы наблюдали выраженное и длительное переполнение микроциркуляторного русла клубочковой и наружной части пучковой зон, что даже приводило к кровоизлияниям, по срокам соответствующее интенсивности снижения уровня катехоламинов в кровотоке. Таким образом, перенаправление крови в воротную вену через корковое вещество было попыткой компенсации недостаточной продукции катехоламинов мозговым веществом, направленной на обеспечение глюконеогенеза в гепатоцитах.

На 70-ые сутки постнатального онтогенеза надпочечники крысы достигают максимума своего развития [22]. У крыс контрольной группы возрастные изменения строения надпочечников заключались как в увеличении его размеров, так и в изменении структуры коркового вещества, при сохранении того же соотношения коркового и мозгового вещества. Выявлено уменьшение размеров клубочковой и сетчатой зон, но уменьшение площади клубочковой зоны было наиболее выраженным. Одновременно происходило увеличение площади пучковой зоны. Это привело к существенным изменениям в соотношении структурно-функциональных зон органа. Если на 42-ые сутки постнатального развития в корковом веществе наиболее крупными были пучковая и сетчатая зоны, то на 70-ые сутки пучковая зона превалировала в корковом веществе, превышая размеры сетчатой в два раза. Преобладание в корковом веществе пучковой зоны с крупными, плотно лежащими клетками объясняет прирост массы органа непропорционально больший приросту его диаметра. Общей чертой строения кортикостероцитов клубочковой и сетчатой зон, а также моз-

гового вещества, было уменьшение размеров клеток. В пучковой зоне напротив, отмечалась гипертрофия клеток. В микроциркуляторном русле также произошли изменения: в клубочковой и в пучковой зонах капилляры значительно сузились, а в сетчатой, наоборот, выявлено расширение капилляров.

Таким образом, морфогенетические процессы в надпочечнике после пубертатного периода сводились к перестройке коркового вещества за счет уменьшения клубочковой и сетчатой зон, что было связано, в том числе и с уменьшением размеров клеток.

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периодах, также происходило увеличение размеров и массы надпочечников. Но развитие коркового и мозгового вещества не было равномерным. Увеличивался объем коркового вещества, но мозговое вещество отставало в развитии, вследствие чего соотношение коркового и мозгового вещества отличалось от контрольных животных более высоким процентом коркового. Принципиальным отличием было отсутствие возрастных изменений в структуре коркового вещества и сохранение соотношения клубочковой, пучковой и сетчатой зон близкому к тому, которое было в пубертатном возрасте. Это стало следствием увеличения площади клубочковой и сетчатой зон наряду с пучковой. Структурные изменения в клубочковой зоне отличались сохранением размеров кортикостероцитов как в предыдущем сроке исследования. Динамика пролиферативных процессов в клубочковой зоне показывает значительное снижение числа делящихся клеток к 70-ым суткам, следовательно, рост клубочковой зоны завершается. В пучковой зоне не только клетки, но и их ядра увеличивались в размерах, а сужения капилляров не наблюдалось. В сетчатой зоне происходили частично сходные с контрольными животными морфодинамические процессы, но увеличение количества клеток в срезе сетчатой зоны было обусловлено увеличением ее площади, а не увеличением числа клеток в единице площади, то есть более рыхлое строение сетчатой зоны сохранялось. Динамика доли Ki-67-позитивных клеток подтверждает подавление пролиферации в сетчатой зоне при воздействии ДДТ.

У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора после рождения, постнатальный морфогенез надпочечников имел сходство, как с животными контрольной группы, так и потреблявшей низкие дозы ДДТ в пре- и постнатальном онтогенезе. Отмечалось увеличение массы и размеров органа, увеличение коркового вещества, но мозговое вещество не увеличивалось. Соотношение коркового и мозгового вещества было таким же, как у крыс контрольной группы. Структура коркового вещества была более схожей с контрольной группой, но отличалась высоким процентом площади клубочковой зоны вследствие сохранения размеров предыдущего срока исследования. В клубочковой зоне кортикостероциты уменьшались в размерах, но диаметр капилляров увеличивался, чего не наблюдалось ни в контроле, ни в группе ДДТ Е0-Р70. Изменения сосудистого русла в пучковой зоне было аналогичным контролю, но кортикостероциты не изменяли своих размеров. Изменения в сетчатой зоне полностью соответствовали контрольным показателям.

Таким образом, у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, общей чертой было уменьшение промежуточной зоны и замедление возрастного регресса клубочковой зоны. Особенностью крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора и в пренатальном и постнатальном периоде, являлось отставание в развитии мозгового вещества и нарушение морфогенетических процессов и корковом веществе, проявляющихся увеличением объемов клубочковой и сетчатой зон после полового созревания. Но низкая плотность кортикостероцитов в сетчатой зоне подтверждает, что это обусловлено действием дисраптора в пренатальном периоде.

Как и в пубертатном периоде, после достижения половой зрелости наблюдались кровоизлияния в пучковой зоне у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ. Отличием крыс, получавшим ДДТ только в постнатальном онтогенезе, были кровоизлияния в сетчатой зоне, что также наиболее вероятно является последствием перераспределения венозного оттока.

Особенностью данного срока исследования было появление лейкоцитарных инфильтратов в пучковой зоне вокруг кортикостероцитов с просветленной

цитоплазмой. Некротические изменения в пучковой зоне на данном сроке исследования не наблюдались. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора с первого дня пренатального развития, встречались в основном лимфоцитарные инфильтраты, а у крыс, воздействие на которых начиналось в постнатальном периоде, – лимфоцитарные и нейтрофильные инфильтраты, что указывает на различные сроки возникновения этих изменений. Появление лимфоцитарной инфильтрации в корковом веществе надпочечников при отсутствии явной аутоиммунной или эндокринной патологии было описано как у человека, так и у домашних животных, что дало авторам основание рассматривать ее как развитие латентного адреналита [37, 63, 107]. В нашем исследовании мы наблюдали гибель кортикостероцитов в пубертатном периоде, но она не сопровождалась лейкоцитарной инфильтрацией. Гибель паренхимы без появления лейкоцитов в участках некроза при воздействии низких доз ДДТ в постнатальном развитии описана в щитовидной железе крыс [15]. На 70-ые сутки мы наблюдали одновременно участки некроза вследствие кровоизлияний в корковом веществе без лейкоцитарной инфильтрации и появление преимущественно лимфоцитарных инфильтратов в участках с нормальной гемодинамикой, но с изменениями в структуре кортикостероцитов, свидетельствующих о развитии в них вакуольной дистрофии. Это дает основание предположить, что гибель кортикостероцитов в пучковой зоне на более ранних сроках исследования могла стать причиной аутоиммунной реакции.

Изменения морфогенетических процессов в мозговом веществе проявлялись как в пубертатном, так и постпубертатном периоде. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пре- и постнатальном периоде, существенного изменения формирования мозгового вещества не наблюдалось, а уменьшение размеров хромаффинных клеток и их ядер связаны со снижением их функциональной активности. Аналогично и у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в постнатальном периоде, отмечалось снижение продукции катехоламинов при нормальных показателях развития мозгового вещества. Следовательно, пренатальное воздействие ДДТ не изменяет программы развития мозгового

вещества. При сравнении экспериментальных групп прослеживается влияние увеличения потребленной дозы и длительности воздействия на структуру и функцию хромаффинных клеток. Основные изменения происходят в постнатальном развитии при переходе от пубертатного периода к половой зрелости. На это указывают и выявленное в пубертатном периоде снижение пролиферации хромаффинных клеток, и последующее выраженное отставание в развитии мозгового вещества в постпубертатном периоде в сочетании со значительным снижением секреторной активности хромаффинных клеток. Известно, что высокодифференцированные хромаффинные клетки надпочечников способны к пролиферации в течение всей жизни особи [217]. Наблюдаемый на 70-ые сутки рост пролиферативной активности хромаффинных клеток указывает на задержку, а не на раннее прекращение развития мозгового вещества.

Роль канонического Wnt-сигналинга в постнатальном морфогенезе коркового вещества

Канонический β -катенин/Wnt-сигналинг играет важную роль в формировании зональности коркового вещества, однако на сегодняшний день в большей степени изучено участие канонического Wnt-сигналинга в развитии и поддержании гомеостаза в клубочковой зоне [20, 44, 95]. Нами было проведено исследование, которое показало, что экспрессия β -катенина и активация канонического Wnt-сигналинга изменяются во всех зонах коркового вещества надпочечника у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора. β -катенин играет роль не только в реализации Wnt-пути, но и в формировании плотных межклеточных контактов путем образования комплексов с E-кадгеринном, что препятствует пролиферации клеток [50].

Снижение активации Wnt-сигналинга в постнатальном развитии обуславливало фрагментарность клубочкового слоя, а уменьшение числа клеток с локализацией β -катенина в плазмолемме свидетельствовало о повышении их пролиферативного потенциала, что подтверждали результаты исследования экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Но уменьшение числа клеток с мембранной локализацией и увеличение численности кортикостероцитов, накапли-

вающих β -КТ в цитоплазме, указывало на начальные стадии его активации, что позволило восстановить целостность клубочковой зоны и увеличить ее площадь к 70-ым суткам постнатального онтогенеза.

В наружных слоях пучковой зоны наблюдались репаративные процессы, которые развивались вследствие трофических нарушений, обусловленных дисциркуляторными расстройствами. Снижение числа клеток с мембранной локализацией β -катенина и ингибирование канонического Wnt-пути в пучковой зоне сочеталось с повышением пролиферативной активности кортикостероцитов и появлением участков с несформировавшейся трабекулярной структурой. Из литературных данных известно, что активация канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга подавляет дифференцировку кортикостероцитов пучковой зоны, но при этом не обнаруживается в пролиферирующих клетках [233]. В настоящем исследовании эти данные нашли свое подтверждение, так как в участках регенерирующей пучковой зоны число β -катенин-позитивных клеток было крайне малым, а подавление активации β -катенина в пучковой зоне сопровождалось повышением пролиферации клеток. В постпубертатном периоде развитие пучковой зоны соответствовало возрастной норме и характеризовалось ингибированием Wnt-сигналинга.

Роль канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга в развитии и обновлении клеточной популяции сетчатой зоны является наименее изученной. Настоящее исследование показывает, что длительное воздействие низких доз ДДТ вызывает отставание в развитии сетчатой зоны на 42-ые сутки постнатального развития, то есть в период, когда она фактически является основным продуцентом андрогенов, поскольку активация стероидогенеза в семенниках у крыс начинается с 50-ых суток [22]. В отличие от клубочковой гипоплазия сетчатой зоны сопровождалась увеличением процента клеток с мембранной локализацией β -катенина, а, следовательно, с усилением формирования межклеточных контактов и пониженной пролиферативной активностью ее кортикостероцитов. Тем не менее, несмотря на ингибирование транслокации β -катенина в ядра, отмечалось увеличение доли клеток, накапливающих этот протеин в цитоплазме, то

есть, отмечалось начало активации β -катенина как в сетчатой, так и клубочковой зонах. Это стимулировало дальнейшее развитие сетчатой зоны, и после достижения половой зрелости наблюдалось ее увеличение, а не регресс. Таким образом, изменения активации β -катенина и морфологические изменения в постнатальном развитии сетчатой и клубочковой зон были аналогичными.

Результаты исследования показывают, что этап активного развития коркового вещества надпочечников у крыс контрольной группы сопровождался снижением содержания β -катенина в мембранах кортикостероцитов без изменения процессов его активации. Эти изменения одинаково хорошо были выражены во всех зонах коркового вещества. У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном развитии, эта закономерность наблюдалась в клубочковой и сетчатой зонах, что также подтверждает гипотезу об одинаковой роли канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в этих зонах. В пучковой зоне особенностью возрастной динамики, не наблюдавшейся у контрольных крыс, было подавление активации Wnt, особенно в зонах регенерации.

Роль канонического Wnt-сигналинга в постнатальном морфогенезе мозгового вещества

Экспрессия β -катенина хромаффинными клетками и роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе нервной ткани и мозгового вещества мало изучена. Однако, накапливающиеся данные показывают, Wnt-сигналинг играет роль в терминальной дифференцировке адренергических нейронов [42]. Исследование контрольной группы показало, что хромаффинные клетки надпочечников экспрессируют β -катенин в постнатальном развитии, причем общее количество β -катенин-позитивных клеток не изменяется, а число клеток с транслокацией β -катенина в ядро после наступления половой зрелости увеличивается. Таким образом, в контрольной группе после наступления половой зрелости наблюдалось усиление активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках и увеличение площади мозгового вещества, что свидетель-

ствует о важной роли этого пути в поддержании численности популяции хромаффинных клеток.

У животных, которые подвергались воздействию эндокринного дисраптора в пренатальном и постнатальном развитии, возрастная динамика экспрессии β -катенина была аналогичной контрольной группе, но численные показатели синтеза этого транскрипционного фактора и активация канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках были существенно снижены, как и размеры мозгового вещества и функциональная активность хромаффинных клеток. В пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первого дня постнатального развития, отмечалось аналогичное контролю развитие мозгового вещества и отсутствие отличий в транслокации β -катенина в ядро. После наступления половой зрелости отсутствие возрастной динамики активации канонического Wnt-сигналинга сочеталось с замедлением развития мозгового вещества. Сравнение изменений экспрессии β -катенина хромаффинными клетками и его транслокации в ядро у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, показывает, что ДДТ оказывает ингибирующее воздействие на эти процессы еще в пренатальном периоде, что и обуславливает пониженный уровень экспрессии этого белка и в пубертатном и в постпубертатном периоде, в то время как постнатальное воздействие дисраптора приводило к менее выраженному подавлению экспрессии β -катенина, а снижение активации Wnt-сигналинга появилось только после наступления половой зрелости. В научной литературе имеются данные, что в пренатальном периоде клетки-предшественники хромаффиноцитов мозгового вещества не экспрессируют рецепторы Wnt и Notch [116, 230]. Полученные нами показывают, что развитие Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках может начинаться в конце пренатального периода. При этом мы выявили, что более выраженное ингибирование канонического Wnt сочеталось с более низкой продукцией адреналина, что косвенно подтверждает данные о роли Wnt-сигналинга в дифференцировке клеток производных нервного гребня и возможной роли в диф-

ференцировке хромаффинных клеток надпочечников [116] и в механизмах их пониженной секреторной активности.

Роль транскрипционного фактора PRH/Nhex в постнатальном морфогенезе надпочечников

Исследование транскрипционного фактора PRH/Nhex эндокриноцитами надпочечников крыс контрольной группы показало идентичность изменений этого показателя не только в различных зонах коркового, но и в мозговом веществе, заключавшемся в повышении его экспрессии к моменту максимального развития органа. Высокая степень корреляции со снижением пролиферативной активности кортикостероцитов указывает на терминирующую роль PRH/Nhex в пролиферации клеток и росте коркового вещества. Эти данные совпадают с имеющимися в научной литературе сведениями о способности PRH/Nhex подавлять на посттранскрипционном уровне экспрессию клетками циклина D1 [221]. В корковом веществе усиление экспрессии PRH/Nhex не связано с изменением интенсивности транслокации β -катенина в ядро, что свидетельствует о независимом от канонического Wnt/ β -катенин сигналинга механизме действия транскрипционного фактора PRH/Nhex в постнатальном развитии, в то время как некоторые данные указывают на способность канонического Wnt/ β -катенин сигналинга модулировать экспрессию PRH/Nhex в эмбриональном периоде [35, 159].

В настоящем исследовании впервые показана экспрессия NHex в хромаффинных клетках. Известно, что производные краниальной части нервной трубки – нейроны головного мозга экспрессируют этот транскрипционный фактор, в то время как производные ганглиозной пластинки – нейроны периферической нервной системы считались PRH/Nhex-негативными [215]. Полученные нами данные доказывают, что и производные ганглиозной пластинки, которыми являются хромаффинные клетки, также экспрессируют PRH/Nhex в постнатальном развитии, и что он также участвует в регуляции постнатального морфогенеза мозгового вещества. В мозговом веществе усиление экспрессии PRH/Nhex в хромаффинных клетках происходило на фоне повышенной актив-

ности Wnt/ β -катенин сигналинга, стимулирующего пролиферативные процессы, что объясняет наименьшую степень снижения пролиферативной активности хромаффинных клеток по сравнению с клетками коркового вещества. Особенностью регуляции пролиферативных процессов в паренхиме мозгового вещества было наличие сильно выраженной прямой зависимости показателя активации канонического Wnt-сигналинга и экспрессии PRH/Nhex у животных контрольной группы и группы, подвергавшейся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в течение пренатального и постнатального развития, эта зависимость была значительно менее выражена. Следовательно, пренатальное воздействие дисраптора нарушало механизмы кооперации двух регуляторов эмбрионального развития. Эти данные позволяют считать, что транскрипционный фактор PRH/Nhex играет роль также и в эмбриональном развитии хромаффинных клеток надпочечников, а не только сердца, печени, тимуса, щитовидной железы [18, 109]. На роль кооперации PRH/Nhex и канонического Wnt-сигналинга указывают и данные морфологического исследования надпочечников, выявившие отставание в развитии мозгового вещества у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию дисраптора. Эта гипотеза также косвенно подтверждается данными о нарушениях эмбрионального развития переднего мозга у PRH-нокаутных мышей [208], свидетельствующих о роли PRH/Nhex в развитии нейроэктодермы.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах развития, онтогенетические изменения экспрессии PRH/Nhex отличались от контрольных. Наиболее выраженные изменения наблюдались в клубочковой зоне и в мозговом веществе и заключались в отсутствии динамики от периода активного развития органа до достижения максимума в развитии. У крыс, потреблявших ДДТ только в постнатальном периоде, диаметрально противоположная динамика экспрессии PRH/Nhex с возрастом в клубочковой зоне и мозговом веществе сочеталась с противоположной динамикой пролиферативной активности, что указывает на изменения про-

граммы развития органа. В корковом веществе наибольшие отличия наблюдались в сетчатой зоне. Отсутствие экспрессии PRH/Nhex и ингибирование Wnt/ β -катенин сигналинга, а также пониженный уровень пролиферации у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в постнатальном развитии, отражают отсутствие динамики морфологических параметров развития сетчатой зоны. У крыс, подвергавшихся дисрапторному действию ДДТ в пре- и постнатальном развитии, активация PRH/Nhex на 70-ые сутки на фоне ингибирования Wnt/ β -катенин сигналинга подавляла деление клеток. Таким образом, это приводило к формированию двух способов морфогенеза сетчатой зоны: с уменьшением площади зоны и увеличением плотности клеток без инволюции в постпубертатном периоде у крыс при воздействии дисраптора в течение постнатального развития и с замедлением формирования зоны в пубертатном периоде и более позднем ее развитии за счет увеличения площади с сохранением пониженной плотности расположения кортикостероцитов в постпубертатном периоде, то есть со смещением темпов развития у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию.

Следовательно, можно прийти к заключению, что постнатальное воздействие ДДТ обуславливает замедление развития сетчатой зоны, но не влияет на развитие компенсаторных изменений, обусловленных инактивацией транскрипционного фактора PRH/Nhex, а пренатальное воздействие ДДТ нарушает регуляцию экспрессии PRH/Nhex, и соответственно, пролиферативных процессов в сетчатой зоне.

4.2. Изменения секреторной деятельности коркового вещества надпочечников

в пубертатном периоде

Воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном онтогенезе вызывало существенные сдвиги в функционировании коркового вещества надпочечников у крыс. В пубертатном возрасте отмечались умеренно повышенный уровень кортикостерона в сыворотке крови и значительное снижение концентрации альдостерона по сравнению с контрольными значениями. Кон-

центрации женских половых стероидов, продуцируемых в сетчатой зоне, существенно снижены, особенно эстрадиола. У крыс стероидогенез в корковом веществе надпочечников имеет особенности, отличающие его от синтеза минералокортикоидов, глюкокортикоидов и половых стероидов у человека. Наблюдаемое повышение продукции кортикостерона могло по принципу обратной связи ингибировать синтез гормонов в АКТГ-зависимых зонах – сетчатой и клубочковой вследствие чувствительности клеток клубочковой и сетчатой зон к АКТГ [51, 52]. Выявленное увеличение концентрации прогестерона и его основного метаболита кортикостерона на фоне пониженной продукции минералокортикоидов и половых стероидов указывает на стимулирующее действие эндокринного дисраптора на стероидогенез в клетках пучковой зоны. Отличительной особенностью крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, являлось повышение уровня 17-оксипрогестерона, чья концентрация в сыворотке крови крыс в норме чрезвычайно мала. Это свидетельствует, что воздействие дисраптора не снижает гидроксилирование прогестерона, а, следовательно, уменьшение продукции половых стероидов связано с нарушением более поздних этапов их синтеза. Таким образом, выявленные изменения, вероятно, обусловлены как непосредственным дисрапторным действием ДДТ, так и реакцией гипоталамо-гипофизарного комплекса.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном развитии, концентрации стероидных гормонов в системном кровотоке качественно отличались от значений у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пре- и постнатальном развитии. В пубертатном периоде у животных данной группы наблюдались пониженный уровень кортикостерона и повышенное содержание альдостерона, эстрадиола, эстрогена и тестостерона. Таким образом, изменения продукции стероидных гормонов были диаметрально противоположны таковым у животных, подвергавшихся воздействию ДДТ как в пренатальном, так и постнатальном периодах онтогенеза. Общей чертой у этих групп были реципрокные соотношения между концентрацией глюкокортикои-

дов и минералокортикоидов, а также половых гормонов, что также указывает на регулирующее влияние АКТГ. Снижение концентрации кортикостерона сопровождалось снижением и уровня его предшественника прогестерона, что указывает на подавление стероидогенеза в клетках пучковой зоны. Уровень 17-оксипрогестерона при этом не отличался от контрольных значений, что на фоне активного превращения в половые стероиды также свидетельствует о том, что ДДТ не нарушает гидроксилирование прогестерона.

Полученные данные показывают, что дисрапторное действие низких доз ДДТ на стероидогенез в отдельных зонах коркового вещества не избирательно в отличие от токсического действия больших доз, вызывающих некроз клеток только в пучковой зоне [146].

Вопрос о механизмах дисрапторного действия на продукцию стероидных гормонов в первую очередь требует установления роли и доминирования либо клеточных, либо молекулярных механизмов в соответствующих структурно-функциональных зонах. Морфологическое исследование надпочечников показало, что воздействие низких доз ДДТ не нарушает основные механизмы органогенеза, но у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном периодах, приводит к уменьшению площади клубочковой зоны. Исследование гистологических препаратов выявило значительные нарушения микроциркуляции в клубочковой зоне, проявляющиеся расширением капилляров, стазом эритроцитов, а также кровоизлияниями на границе клубочковой и пучковой зон. Известно, что гипоксия вызывает снижение секреторной активности клеток клубочковой зоны [52]. Снижение функциональной активности проявляется уменьшением размеров клеток, уменьшением ЭПС, отсутствием отека матрикса и расширения крист митохондрий и накоплением липидов в цитоплазме [3]. Эти изменения наблюдались у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию дисраптора. Также наблюдались изменения, свидетельствующие об активации синтеза белков. У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном онтогенезе, уменьшения площади клубочковой зоны не было выявлено. Стазы эритроцитов в сосудах микроцирку-

ляторного русла в клубочковой зоне не наблюдались, а очаговые кровоизлияния на границе клубочковой и пучковой зон встречались реже. Наблюдались изменения ультраструктуры клеток, свидетельствующие об их усиленной секреторной деятельности: набухание митохондрий, расширение перинуклеарного пространства, более развитая ЭПС, уменьшение содержания липидов в цитоплазме [3]. Следовательно, уменьшение продукции альдостерона у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, было связано не только с недостаточным развитием клубочковой зоны, но и снижением стероидогенной активности кортикостероцитов, во многом обусловленной нарушениями микроциркуляции, приводящими к гипоксии. Причины повышения продукции альдостерона у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора только в постнатальном периоде, могут быть связаны со стимулирующим действием ДДТ на ренин-ангиотензиновую систему. Но отсутствие повышения продукции альдостерона в пубертатном периоде у крыс, подвергающихся ежедневному воздействию низких доз ДДТ, указывают на ингибирование стероидогенной активности в клетках клубочковой зоны, а ультраструктурные изменения указывают на вероятное усиление синтеза ферментов, катализирующих реакции стероидогенеза, что позволяет нормализовать в постпубертатном периоде продукцию альдостерона. Возможно, что ДДТ, подавляя синтез гормона, вызывал реактивное повышение активности стероидогенеза, особенно в митохондриях, к пубертатному периоду, которое было выявлено у крыс, потреблявших ДДТ с первого дня жизни, а у крыс, подвергавшихся воздействию с пренатального периода, в аналогичном возрасте реактивные изменения могли уже истощиться. Аналогичные по характеру изменения были выявлены в изменении продукции тиреоидных гормонов при воздействии на организм различных по продолжительности и дозам воздействию ДДТ на половозрелых крыс Вистар [13, 14].

Наиболее важным наблюдением является идентичность морфологических изменений пучковой зоны у экспериментальных групп при диаметрально противоположных показателях их секреторной активности. Пучковая зона является наиболее чувствительной к действию АКТГ, но оценить взаимоотноше-

ния изменений продукции глюкокортикоидов по уровню АКТГ в системном кровотоке крайне затруднительно из-за существования так называемой диссоциации АКТГ и глюкокортикоидов [222], при которой четкой реципрокной зависимости этих показателей не наблюдается в отличие от других гипофиззависимых гормонов, например, тиреоидных. Кортикостероциты клубочковой и пучковой зон у крыс имеют почти одинаковый набор ферментов, следовательно, стимуляция АКТГ должна приводить к одинаковым изменениям стероидогенеза. Но вследствие более сложной тройной регуляции клеток клубочковой зоны, продукция минералокортикоидов может отличаться. Наблюдаемое у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию ДДТ, снижение уровня альдостерона и половых гормонов и повышение кортикостерона при повышенном уровне прогестерона и 17-оксипрогестерона свидетельствует о повышении гидроксилирования прогестерона под действием ДДТ. У крыс, получавших ДДТ в постнатальном периоде онтогенеза, пониженный уровень прогестерона закономерно сочетался со снижением основного продукта его превращения кортикостерона, но уровень 17-оксипрогестерона не уменьшался, что подтверждает преимущественное гидроксилирование прогестерона у 17-го атома углерода над 21-ым как один из молекулярных механизмов дисрапторного действия ДДТ.

Изменения продукции кортикостерона могут отражать выраженность как дегенеративных, так и регенеративных процессов в пучковой зоне. Появление участков гибели клеток и участков дистрофических изменений, связанных с нарушениями микроциркуляции, приводило к уменьшению среднего размера клеток и их ядер в пучковой зоне у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию дисраптора. Электронно-микроскопическое исследование показало, что в тех участках пучковой зоны, где не выявлены нарушения микроциркуляции, кортикостероциты демонстрируют признаки повышенной функциональной активности, в том числе и синтеза белковых продуктов, таких как увеличение размеров митохондрий и большее число митохондрий в цитоплазме, расширение канальцев ЭПС и гЭПС, увеличение разме-

ров комплекса Гольджи. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном периоде, дистрофические изменения были менее выражены, что обуславливало более крупные размеры клеток и ядер. Признаки повышенной функциональной активности, особенно митохондрий, были ярко выражены. Отличием от крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ и в пренатальном, и постнатальном периодах, было соответствующее контролю количество митохондрий в 1мм^2 цитоплазмы. Следовательно, увеличение численности митохондрий можно рассматривать как компенсаторное изменение, обусловленное деструктивными изменениями в пучковой зоне, направленное на активацию секреторной деятельности в условиях продолжающегося воздействия дисраптора. В научной литературе имеются данные о способности митохондриального фермента кортикостероцитов 11β -гидроксилазы метаболизировать производные ДДТ [154], следовательно, увеличение числа митохондрий может быть направлено и на усиление инактивации ДДТ. Сопоставление ультраструктурных изменений кортикостероцитов пучковой зоны и уровня кортикостерона в сыворотке крови указывает на подавление продукции гормона вследствие нарушений микроциркуляции и гибели кортикостероцитов в наружной части пучковой зоны, а активация стероидогенеза осуществляется во внутреннем слое пучковой зоны за счет реактивного усиления продукции ферментов стероидогенеза и активации митохондриального и цитоплазматического этапов синтеза стероидов, а также за счет развития компенсаторных изменений в клетках в виде увеличения численности митохондрий. Изменения, у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора только в постнатальном развитии, отражают более раннюю стадию, а подвергавшихся воздействию дисраптора в пре- и постнатальном периодах, – более позднюю стадию изменений стероидогенеза с развитием не только функциональных, но и структурных изменений в клетках.

Особенности возрастной динамики секреторных процессов в корковом веществе и их отличия после достижения половой зрелости

После достижения половой зрелости секреторная деятельность клеток коркового вещества крыс контрольной группы изменилась, но эти изменения не были одинаковыми в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах. Синтез альдостерона увеличился, а кортикостерона и женских половых стероидов уменьшился. Снижение синтеза прогестерона сопровождалось его усиленным гидроксилированием, что обусловлено активацией синтеза тестостерона, начинающейся на 50-ые сутки постнатального развития у самцов крыс [22]. Активация функции семенников сопровождалась снижением ароматизации как тестостерона, так и андростендиона.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, возрастные изменения продукции минерало- и глюкокортикоидов соответствовали контрольным, а эстрогенов существенно отличались. Отмечавшееся увеличение синтеза эстрадиола происходило одновременно со снижением 17-оксипрогестерона и указывает на проявление антиандрогенного эффекта ДДТ, связанного с усилением конвертации тестостерона в эстрадиол. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии, отмечались наименьшие значения продукции прогестерона, однако его 17-гидроксилирование также было усилено. Возрастное снижение синтеза эстрадиола и эстрона было более выраженным, чем в контроле, то есть антиандрогенного действия не отмечалось. Таким образом, антиандрогенный эффект низких доз ДДТ является следствием действия дисраптора в пренатальном периоде. К моменту максимального развития надпочечника у крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию, отмечалась нормализация уровня кортикостерона, но не альдостерона, концентрация которого в системном кровотоке не изменялась по сравнению с пубертатным периодом. Реципрокных отношений альдостерона и кортикостерона, характерных для обеих опытных групп в пубертатном периоде, после наступления половой зрелости не наблюдалось.

Возрастные изменения синтеза стероидов сопровождались и изменениями ультраструктурных проявлений секреторного процесса. Если в пубертатном периоде активный синтез стероидов в клубочковой зоне крыс контрольной

группы проявлялся отеком мактрикса митохондрий, свидетельствующих об усилении также и процессов биологического окисления, то после половой зрелости повышение продукции альдостерона обеспечивалось также и структурной реорганизацией митохондрий, а именно, увеличением их числа, уменьшением размера и появлением гетероморфности крист, что по литературным данным сопровождается усилением функциональной активности кортикостероцитов [85]. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, наблюдались схожие возрастные изменения ультраструктуры кортикостероцитов, но меньшее число митохондрий в клетках, уменьшение функциональной нагрузки на митохондрии и большее содержание липидов в цитоплазме указывало на более низкую по сравнению с контролем функциональную активность клеток. Следовательно, нормализация синтеза альдостерона достигалась за счет большего числа клеток в клубочковой зоне, что указывает на негативное действие дисраптора на секреторный процесс. У крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ, возрастные изменения митохондрий не соответствовали контрольным. Ультраструктура клеток свидетельствовала о пониженной функциональной активности, включая и значительное уменьшение размеров клеток и числа митохондрий. Митохондрии играют ключевую роль в стероидогенезе, так как и начальный, и конечный этапы синтеза альдостерона происходят именно в них [63]. Соответственно, значительное уменьшение численности митохондрий в клетке существенно снижает ее функциональный потенциал. Наблюдавшееся уменьшение числа митохондрий в клетках клубочковой зоны у половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, позволяет рассматривать данное явление как результат дисрапторного действия ДДТ. Таким образом, если на 42-ые сутки гиперпродукция альдостерона достигалась за счет усиления синтеза стероидов в митохондриях и цитоплазме, то на 70-ые сутки аналогичный уровень продукции гормонов обеспечивался за счет увеличения числа клеток в клубочковой зоне. Но так как уровень альдостерона был ниже контрольных значений, следовательно, больший объем клубочковой зоны не позволял нормализовать продукцию альдостерона, что подтверждает пора-

жение митохондриальное звено стероидогенеза как механизм дисрапторного действия ДДТ на клетки клубочковой зоны.

После достижения половой зрелости у крыс контрольной группы отмечено снижение функциональной активности кортикостероцитов пучковой зоны на фоне увеличения ее объема. У клеток увеличивался объем цитоплазмы без увеличения размеров ядра. Увеличение размера митохондрии и, соответственно, уменьшение их числа в единице объема цитоплазмы компенсировалось увеличением объема цитоплазмы. Таким образом, пучковая зона формировала функциональный резерв, необходимый для экстренного усиления продукции кортикостерона при возникновении стрессовой реакции. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном периодах, возрастные изменения были более выражены, чем у контрольных животных, за исключением отсутствия снижения функционального напряжения митохондрий. Наибольшие изменения наблюдались в пучковой зоне крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию дисраптора. Наименьшая степень развития пучковой зоны сочеталась с крайне слабой возрастной динамикой ультраструктурных показателей кортикостероцитов. Снижения функциональной активности клеток как в контроле не наблюдалось, напротив, отмечалось увеличение продукции кортикостерона за счет высокой активности синтеза белков (ферментов стероидогенеза) и самих стероидов, о чем свидетельствовали ультраструктурные признаки усиления синтеза белка (увеличение гЭПС и комплекса Гольджи, числа свободных рибосом в цитоплазме) и стероидов (увеличение площади ЭПС, увеличение размеров митохондрий, везикуляция крист [3]. Различная динамика как биохимических, так и ультраструктурных изменений в клетках пучковой зоны крыс опытных групп указывают на различную скорость развития реакции на дисрапторное действие ДДТ. Очевидно, что у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию дисраптора, активация стероидогенеза происходила раньше и ее структурные проявления в возрасте 42-х суток аналогичны таковым у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в постнатальном развитии.

Светооптическое исследование препаратов надпочечников показало, что у крыс, развивавшихся в условиях пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора, отмечалась гипоплазия сетчатой зоны в пубертатном периоде. Электронно-микроскопическое исследование выявило признаки пониженной секреторной активности кортикостероцитов сетчатой зоны. Это объясняет наблюдаемое снижение продукции половых гормонов. При этом клетки имели более крупные размеры, а количество митохондрий в них было значительно больше, чем в контроле. Это указывает на начало развития в клетках компенсаторных перестроек, направленных на усиление продукции половых стероидов. Известно, что у крыс адренархе происходит на 21-ые сутки и до 50-ых суток постнатального развития сетчатая зона надпочечников является основным продуцентом половых гормонов [22]. В наших исследованиях мы выявили аналогичные ультраструктурные изменения в виде увеличения численности митохондрий в клетках пучковой зоны у крыс пубертатного возраста, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ. Увеличение числа митохондрий является типичным изменением, направленным на интенсификацию стероидогенеза [85]. Причина развития компенсаторных изменений ультраструктуры клеток может быть двоякой. С одной стороны, это может быть вызвано гипоплазией сетчатой зоны, а с другой стороны может быть обусловлено также и дисрапторным действием ДДТ на стероидогенез. Но при исследовании пучковой зоны мы не обнаруживали отставания в ее развитии. Следовательно, эти изменения могли быть обусловлены ингибированием ДДТ синтеза половых гормонов в клетках сетчатой зоны, что подтверждается выявлением меньшего количества клеток с активными признаками стероидогенеза. В научной литературе имеются данные, что о,п-ДДД, являющийся метаболитом о,п-ДДТ, способен связываться с клетками сетчатой зоны, но авторы не обнаруживали при этом изменения продукции половых стероидов [146]. Результаты настоящего исследования показывают способность низких доз ДДТ изменять и развитие сетчатой зоны и структурное обеспечение секреторных процессов в ее клетках.

Электронно-микроскопическое исследование сетчатой зоны после наступления половой зрелости показало, что у интактных крыс происходит перестройка митохондриального аппарата – меньшее количество более крупных митохондрий заменяется большим числом менее крупных митохондрий. Площадь сетчатой зоны при этом не изменяется. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, темпы постнатального развития были изменены. Сетчатая зона начинала увеличиваться в размерах более поздно, а реорганизация митохондриального аппарата ее кортикостероидов происходила раньше, чем у контрольных животных. У крыс, подвергавшихся воздействию только в постнатальном развитии, формирование сетчатой зоны также запаздывало, но ультраструктурные изменения развивались в те же сроки, что и в контроле и даже были более выражены. Эти данные позволяют прийти к выводу, что пренатальное воздействие дисраптора вызывает более ранние компенсаторные изменения секреторной деятельности, связанные с необходимостью повысить продукцию половых стероидов в пубертатном периоде.

Сопоставление значений таких показателей как объем цитоплазмы, диаметр митохондрий и их численность в мкм^2 цитоплазмы в динамике показал, что у крыс контрольной группы переход от пубертатного периода к половой зрелости сопровождался уменьшением числа митохондрий в кортикостероидных пучковой зоны и повышением – в клубочковой и сетчатой. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия дисраптора, в клубочковой зоне наблюдалась аналогичная динамика, но она была более выражена. В пучковой зоне, напротив, у крыс отмечалось увеличение числа митохондрий, причем у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора только в постнатальном развитии, эти изменения происходили в пубертатном периоде, а у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, и после наступления половой зрелости, что указывает на роль пренатального периода в программировании параметров структурного обеспечения секреторной деятельности. В норме увеличение числа митохондрий и уменьшение их размеров в кортикостероид-

тах пучковой зоны происходит в процессе старения, то есть позже, чем в других зонах [29], что указывает на изменение темпов возрастной перестройки митохондриального компартмента. В сетчатой зоне, у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, динамика удельной численности митохондрий была положительной, а у крыс, подвергавшихся только постнатальному воздействию, отсутствовала. Таким образом, возрастная реорганизация митохондриального аппарата кортикостероцитов была нарушена, то есть кортикостероциты сетчатой зоны в постнатальном развитии демонстрировали большую чувствительность к дисрапторному действию ДДТ, что подтверждают и данные стероидного гормонального профиля крыс.

4.3. Изменения в секреторной деятельности хромаффинных клеток мозгового вещества

Полученные данные показывают, что у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, происходит уменьшение содержания в плазме и адреналина, и норадреналина. Наибольшую чувствительность к воздействию низких доз дисраптора проявляет норадреналин. Это приводит к нарушению баланса катехоламинов в сторону увеличения более сильного стимулятора адренорецепторов – адреналина, что возможно является изменением, направленным на компенсацию недостаточности катехоламинов. После наступления половой зрелости уменьшение содержания адреналина и норадреналина становится еще более выраженным. Выраженность снижения концентрации катехоламинов и преобладающее уменьшение концентрации норадреналина в обеих опытных группах указывают, что основной механизм уменьшения их содержания в системном кровотоке – это снижение секреции, а не усиление инактивации этих соединений. Сравнение изменений, наблюдаемых у половозрелых крыс, подвергшихся пре- и постнатальному воздействию с животными, подвергшимися только постнатальному воздействию, показывает не только их сходство, но и отличия, такие как большая степень снижения продукции катехоламинов, особенно норадреналина у половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора только в постнатальном онтогенезе.

Исследование в онтогенетическом аспекте показывает, что у интактных крыс суммарное содержание адреналина и норадреналина с возрастом мало изменяется, но соотношение адреналин/норадреналин снижается за счет уменьшения секреции адреналина. У крыс, подвергавшихся длительному действию ДДТ, динамика содержания адреналина и норадреналина в плазме имеет аналогичный характер, но уменьшение концентрации норадреналина более выражено. Возрастные изменения соотношения этих двух катехоламинов, соответственно, характеризуются повышением, что говорит о существенном дисбалансе в гормональной регуляции, поскольку норадреналин не обладает столь выраженным действием на обмен углеводов и липидов, как адреналин, секреция которого, помимо нейрональной регуляции, стимулируется также инсулином, глюкокортикоидами, ангиотензином II [124]. Выявленные изменения продукции катехоламинов позволяют рассматривать воздействие низких доз ДДТ как потенциальный фактор риска, нарушающий функционирование нервной системы. В научной литературе имеются сведения о связи между пренатальным воздействием ДДТ на организм и последующими нарушениями высшей нервной деятельности, задержкой умственного развития, увеличением случаев синдрома дефицита внимания, а также поведенческими отклонениями, что как правило, связывают с дисрапторным действием ДДТ на функционирование щитовидной железы и половых желез [198]. Однако наши данные указывают на возможность и прямого влияния дисраптора на функцию нервной системы за счет снижения уровня катехоламинов и их дисбаланса, что может стать причиной нарушения защитных реакций организма в ответ на стресс.

Содержание норадреналина в плазме отражает активность периферической симпатической нервной системы, в то время как содержание адреналина указывает на активность мозгового вещества надпочечников, так как свыше 90% содержащегося в системном кровотоке адреналина поступает в него именно из надпочечников. Следовательно, выявленные изменения в продукции обоих катехоламинов позволяют заключить, что снижение синтеза адреналина

при воздействии низких доз ДДТ обусловлено не уменьшением метилирования норадреналина, а связано со снижением его продукции, и что этот процесс происходит как в хромаффинных клетках надпочечников, так и в нейронах периферической нервной системы. Также важно отметить, что снижение продукции адреналина в пубертатном периоде одинаково наблюдалось у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора как в пренатальном и постнатальном, так и только в постнатальном периодах развития, в то время как изменения синтеза минералокортикоидов и глюкокортикоидов были диаметрально противоположными в этих опытных группах. Эти данные подчеркивают важность оценки секреторной деятельности хромаффинных клеток. Изучение ультраструктурных проявлений секреции в адреналоцитах показало, что в пубертатном периоде у крыс, развивавшихся в условиях воздействия дисраптора, изменения в адреналоцитах были минимальными и сводились к уменьшению числа митохондрий в клетках. Известно, что митохондрии в хромаффинных клетках выполняют не только функции биологического окисления и окислительного фосфорилирования, но и, располагаясь под плазмолеммой, участвуют в экзоцитозе гранул, регулируя наряду с эндоплазматической сетью содержание и транспорт ионов кальция [108, 212]. У крыс экспериментальных групп митохондрии располагались преимущественно парануклеарно. Секреторные гранулы, которые способны выделять содержимое за счет растворения и молекулярной секреции, практически не отличались по структуре от контрольных животных. Эти данные свидетельствуют об уменьшении выделения адреналина. В норадреналоцитах отмечено как меньшее содержание секреторных гранул, так и увеличение размеров митохондрий без изменения их числа. Следовательно, в изменениях секреторной деятельности хромаффинных клеток при дисрапторном воздействии ДДТ важную роль играет функционирование митохондрий. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первого дня постнатального развития, выявлены значительные изменения митохондрий как в адреналоцитах, так и норадреналоцитах. Набухание митохондрий обуславливало уменьшение их содержания в единице площади цитоплазмы. Наблюдавшийся

отек матрикса и деструкция крист свидетельствуют о повышении функциональной активности митохондрий, что подтверждает пониженное содержание секреторных гранул в цитоплазме адреноцитов и адекватное контрольным значениям содержание адреналина в плазме крови. Сопоставление ультраструктурных изменений у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном и только постнатальном периодах указывает на усиление функциональной нагрузки и гибель митохондрий как один из механизмов нарушения секреторной деятельности клеток.

Особенности возрастной динамики секреторных процессов в мозговом веществе

Исследование ультраструктуры адреноцитов крыс контрольной группы показало, что механизмы их секреторной деятельности отличались в пубертатном и постпубертатном периоде. После достижения половой зрелости отмечалось уменьшение продукции адреналина. В клетках наблюдалось значительное усиление функциональной нагрузки на митохондрии и изменение способа выделения секреторного продукта. Происходило массивное обводнение цитоплазмы и растворение содержимого гранул. Подобные явления, называемые молекулярным способом выделения, характерны для клеток, оформляющих секреторные продукты в гранулы [12, 16, 61, 71, 88]. В пубертатном периоде молекулярный способ был практически не выражен, превалировало выделение гранул из клеток. Сравнительный анализ ультраструктуры адреноцитов и норадреноцитов показал, что молекулярный способ выделения в норадреноцитах выражен в меньшей степени.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, возрастные изменения секреторной деятельности также присутствовали. Наличие опустошенных участков в цитоплазме и меньшая степень выраженности молекулярного способа секреции в сочетании с пониженной концентрацией адреналина в системном кровотоке указывает на нарушение фазы синтеза и оформления секрета. Увеличение числа лизосом свидетельствует о нормальном функционировании комплекса Гольджи. Следова-

тельно, основной причиной снижения уровня адреналина является нарушение его синтеза. Отек матрикса митохондрий и усиление лизосомальной реакции при низком содержании секреторного продукта указывает на нарушение трофики клеток, что вероятно связано с наблюдавшимися микроциркуляторными расстройствами, приводившими к диапедезу эритроцитов.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ только в постнатальном развитии, особенности ультраструктуры хромаффинных клеток указывали на восстановление митохондриального аппарата клетки. Появление митохондрий небольшого размера без отека матрикса и увеличение общего числа митохондрий в клетках было наиболее ярко выражено в норадреналоцитах. Появление большого числа секреторных гранул с высоким содержанием секреторных продуктов и без признаков молекулярного способа выделения указывает на нормализацию синтетических процессов и нарушение фазы выделения секреторных гранул. Аналогичные изменения, связанные с нарушением выделения секреторных гранул, содержащих тироглобулин, и их скоплением под апикальной плазмалеммой фолликулярных тироцитов были ранее выявлены в работах Н.В. Ягловой с соавт., изучавших воздействие низких доз ДДТ в постнатальном развитии на секреторную деятельность щитовидной железы [15]. Это дает основание предположить, что ДДТ нарушает механизмы выделения секреторного материала из хромаффинных клеток, что приводит к усилению функционирования и гибели митохондрий, как основных структур, обеспечивающих экзоцитоз гранул в хромаффинных клетках. Основным стимулом выделения секреторных гранул из хромаффинных клеток является импульсы вегетативной нервной системы. При проведении импульсов в преганглионарном нерве высвобождается ацетилхолин, который, повышая проницаемость мембраны, вызывает ее деполяризацию и увеличивает приток кальция. Электронно-микроскопическое исследование мозгового вещества надпочечников не обнаружило существенных изменений структуры шванновских клеток, безмиелиновых и миелиновых нервных волокон, что позволяет исключить нарушение их структуры как одну из причин снижения секреторной активности хромаф-

финных клеток. Возможно, дисрапторное действие ДДТ, приводящее к нарушению экзоцитоза секреторных гранул связано с нарушением работы ионных каналов. В прошлом веке высказывалось предположение о подобном механизме нейротоксичного действия пестицида [4]. В работах Ягловой Н.В. показано, что ДДТ способен нарушать синтез белков, осуществляющих транспорт ионов через плазматическую мембрану, в частности натрий-йодного симпортера [14], что позволяет предположить и такой механизм нарушения секреторной деятельности. В пользу этой гипотезы свидетельствует и схожесть изменений в митохондриях клеток коркового и мозгового веществ, несмотря на различную роль этих органелл в секреторной деятельности стероид- и катехоламин-продуцирующих клеток.

Сопоставление изменения концентрации катехоламинов в системном кровотоке и ультраструктуры хромаффиноцитов у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном, и только в постнатальном периодах, показывает, что дисрапторное действие проявляется уже в пренатальном развитии, что обуславливает более раннее наступление изменений и развитие реактивных процессов, а соответственно, и более высокий уровень катехоламинов после достижения половой зрелости. Следовательно, пренатальное воздействие ДДТ изменяет темпы развития хромаффинных клеток, но не программу осуществления в них секреторных процессов. Немаловажную роль в обеспечении секреции катехоламинов играет и усиление пролиферации хромаффинных клеток, наблюдаемое на 70-ые сутки у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ. Различия, наблюдаемые в количестве Ki-67-позитивных хромаффиноцитов, у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в разные периоды развития, показывают более высокую пролиферативную активность в группе, подвергавшихся воздействию дисраптора в пре- и постнатальном развитии, нежели только в постнатальном, что также указывает на более раннюю активацию пролиферации. Поскольку клетки мозгового вещества надпочечников хорошо пролиферируют в ответ на различные стимулы [217], хотя и характеризуются крайне низкой способностью к репаративной регенерации по сравнению с

клетками коркового вещества [1], то наблюдаемое усиление пролиферации на фоне отставания в развитии можно рассматривать не только как нарушение темпов постнатального морфогенеза, но и как компенсаторное изменение, обусловленное необходимостью долгосрочного восстановления синтеза и выделения катехоламинов. На это указывает и то, что на пролиферативная активность у крыс опытных групп в возрасте 70-ти суток превышала значения контрольной не только в аналогичном возрасте, но и на 42-ые сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пределах максимально допустимых уровней его содержания в пищевых продуктах на развивающийся организм с первого дня пренатального развития изменяет морфогенетические процессы в надпочечниках. Механизмами этих изменений являются нарушения транскрипционной регуляции в первую очередь пролиферативных процессов. Корковое вещество надпочечников демонстрирует чувствительность как к пренатальному, так и постнатальному воздействию дисраптора, особенно его клубочковая и сетчатая зоны. Пучковая зона в меньшей степени подвержена дисрапторному действию низких доз ДДТ в отличие от действия токсичных доз его метаболитов.

Исследование показало, что воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах вызывает существенные изменения стероидогенеза в корковом веществе надпочечников, затрагивающие продукцию как минералокортикоидов, так и глюкокортикоидов и половых стероидов. В изменении функциональной активности клубочковой зоны играет роль снижение темпов ее морфогенеза, обусловленных пренатальным воздействием дисраптора, подавляющим канонический Wnt-сигналинг и активирующий антипролиферативный фактор Nhex. Также снижение синтеза альдостерона является следствием нарушения реорганизации митохондриального аппарата кортикостероцитов и нарушения гемоциркуляции на границе клубочковой и пучковой зон, обусловленных перераспределением венозного оттока от мозгового вещества, направленного на компенсацию недостаточной продукции катехоламинов. В

совокупности эти изменения индуцируют пролиферативные процессы и относительную гиперплазию клубочковой зоны после полового созревания (рис. 104).

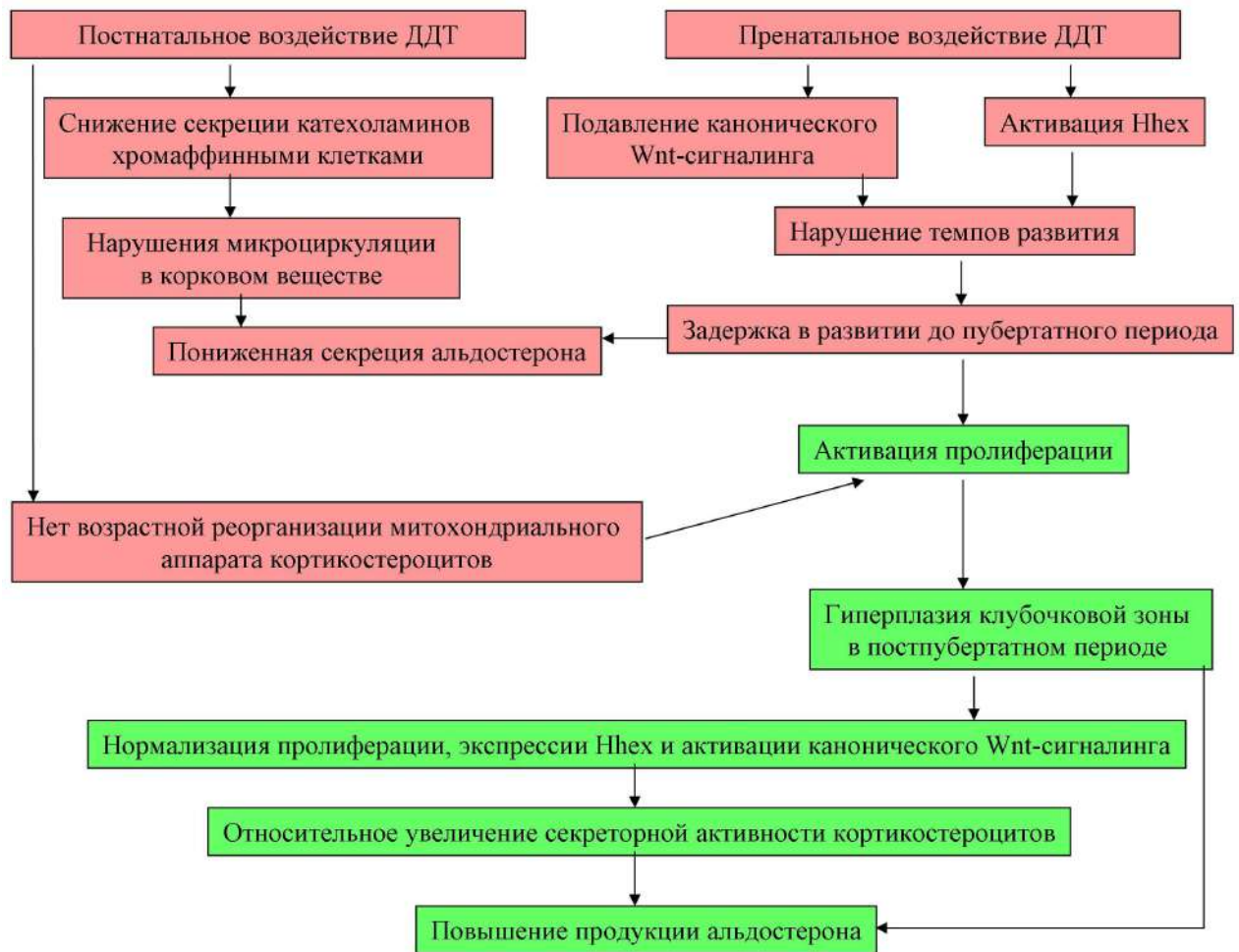


Рис. 104. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности клубочковой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Установлено, что пре- и постнатальное воздействие эндокринного дисраптора, существенно не влияет на морфогенез пучковой зоны. Деструктивные и репаративные процессы, происходящие в ней в пубертатном периоде, являются следствием нарушений микроциркуляции. Пренатальное и постнатальное воздействие дисраптора обуславливает более быстрое развитие нарушений трофики клеток в наружной части пучковой зоны, нежели только постнатальное воздействие, вызывая реактивное усиление секреторной деятельности в более глубоких слоях, а затем увеличение числа митохондрий в клетках

как компенсаторное изменение к воздействию дисраптора. Этому способствует подавление канонического Wnt-сигналинга (рис. 105).



Рис. 105. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности пучковой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Сетчатая зона надпочечников также проявляет чувствительность к действию низких доз ДДТ. Пренатальное воздействие дисраптора приводит к значительному отставанию в развитии сетчатой зоны, что в свою очередь, обуславливает пониженную функциональную активность ее кортикостероцитов. Менее выраженная активация транскрипционного фактора Nhex позволяет поддерживать пролиферативные процессы на более высоком уровне, что способствует увеличению объема сетчатой зоны в постпубертатном периоде. Увеличение числа кортикостероцитов в сочетании с увеличением числа митохондрий и гипертрофией клеток позволяет увеличить продукцию половых гормонов, но дисрапторное действие ДДТ приводит к усилению синтеза эстрогенов у самцов (рис. 106).

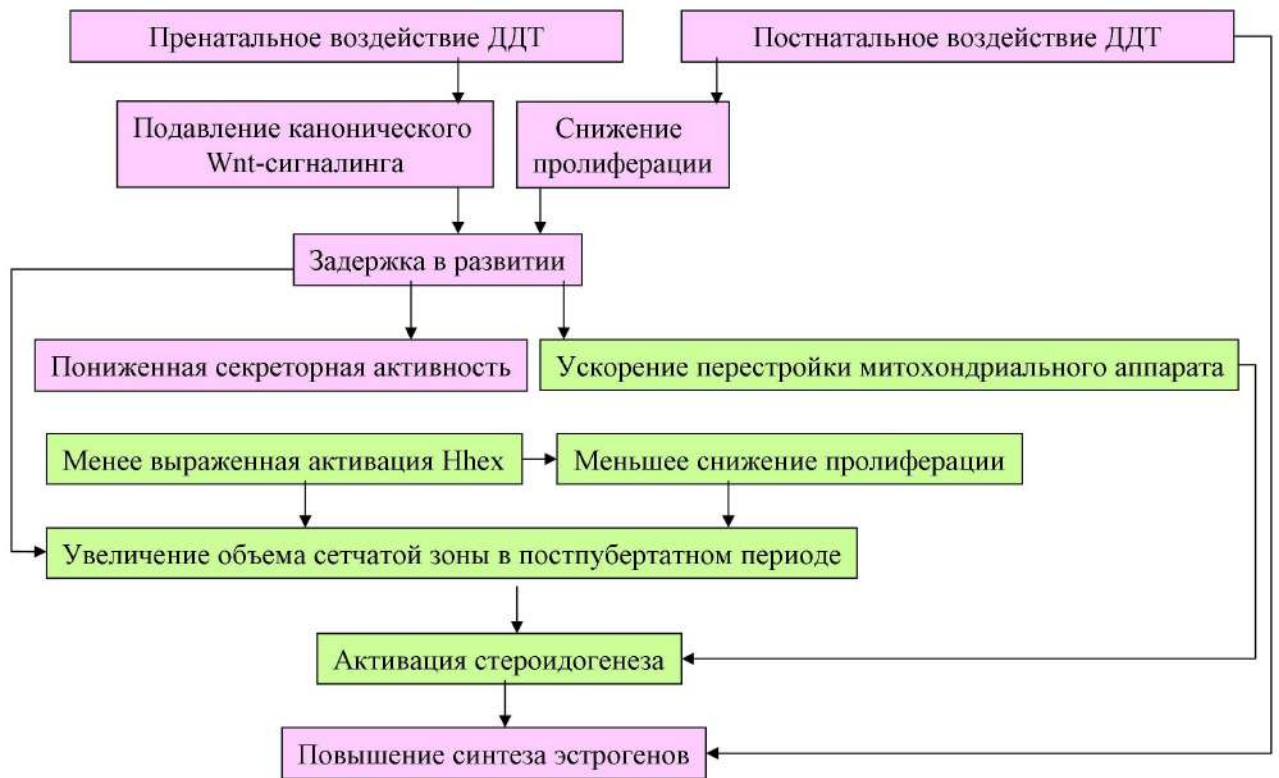


Рис. 106. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности сетчатой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Морфогенетические процессы в мозговом веществе менее чувствительны к пренатальному воздействию дисраптора. Наибольшие структурные и функциональные отклонения в строении мозгового вещества проявляются при переходе от пубертатного периода к половой зрелости. Одним из механизмов дисрапторного действия ДДТ является нарушение транскрипционной регуляции пролиферативных процессов, заключающихся в подавлении активации канонического Wnt-сигналинга и нарушении экспрессии транскрипционного фактора PRH/Nhex. Впервые показана роль Nhex в регуляции процессов пролиферации хромаффинных клеток, особенности его экспрессии и кооперации с каноническим Wnt-сигналингом, отличающие хромаффинные клетки от кортикостероцитов.



Рис. 107. Изменения морфогенеза мозгового вещества надпочечников и секреторной деятельности хромаффинных клеток вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах вызывает нарушение секреции катехоламинов, что обусловлено замедлением темпов развития мозгового вещества и цитофизиологическими изменениями хромаффинных клеток. Воздействие ДДТ приводит к нарушению функционирования и гибели митохондрий, а, следовательно, к снижению экзоцитоза секреторных гранул и снижению синтетических процессов в хромаффиноцитах. Изменения на клеточном уровне, направленные на восстановление нормального уровня продукции катехоламинов, заключаются в усилении процессов синтеза в клетках и активации молекулярной секреции катехоламинов. Истощение реактивных изменений приводит к подавлению фазы синтеза и оформления секрета, а также его выделения, что сопровождается выраженным усилением пролиферативной активности хромаффинных клеток. Недостаточное поступление катехоламинов в системный кровоток, вызывает

перераспределение венозного оттока и выраженные нарушения микроциркуляции в наружной части коркового вещества, запускающие каскад цито- и гистологических изменений в клубочковой и пучковой зонах (рис. 107).

Полученные данные указывают на выраженность дисрапторного действия низких доз ДДТ и как следствие, небезопасность их воздействия и в пренатальном и в постнатальном периодах онтогенеза. Нарушения функции надпочечников и регуляции физиологических функций органов и систем их гормонами может быть причиной как дисморфогенетических, так и функциональных расстройств, обуславливающих развитие разнообразных патологических процессов, в первую очередь, вследствие нарушения функции иммунной, репродуктивной и сердечно-сосудистой систем (рис. 108).



Рис. 108. Механизмы действия эндокринного дисраптора ДДТ на морфогенетические и секреторные процессы в надпочечнике крысы.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, предусмотренных нормативами его содержания в пищевых продуктах, на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах вызывает изменения у крыс постнатального морфогенеза коркового и мозгового вещества надпочечников и нарушает их секреторную деятельность как в пубертатном периоде, так и после достижения половой зрелости.
2. Воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах обуславливает в пубертатном периоде отставание в развитии клубочковой и сетчатой зон коркового вещества и ускорение их развития после достижения половой зрелости и не оказывает влияния на темпы развития пучковой зоны. Деструктивные изменения в наружной части пучковой зоны в пубертатном периоде, опосредованные снижением синтеза катехоламинов и локальным нарушением микроциркуляции на границе зон, а в постпубертатном периоде также и с развитием адреналита.
3. Дисморфогенетическое действие низких доз ДДТ на мозговое вещество надпочечников проявляется при воздействии дисраптора в постнатальном развитии и заключается в снижении пролиферативной активности хромаффинных клеток и замедлении темпов развития мозгового вещества при переходе от пубертатного периода к половой зрелости.
4. Подавление активации канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга, обусловленное действием эндокринного дисраптора ДДТ, вызывает гипоплазию клубочковой и сетчатой зон. Наиболее длительное подавление канонического Wnt и, соответственно, пролиферативных процессов, наблюдается в сетчатой зоне, что указывает на важную роль этого сигнального пути в ее морфогенезе. Репаративная регенерация в пучковой зоне в пубертатном периоде сопровождается подавлением канонического Wnt-сигналинга.

5. Развитие мозгового вещества надпочечников при переходе от пубертатного периода к половой зрелости в норме сопровождается активацией канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках. Более поздняя активация канонического Wnt-сигналинга, обусловленная воздействием эндокринного дисраптора ДДТ, является причиной замедления развития мозгового вещества надпочечника.
6. Транскрипционный фактор PRH/Nhex оказывает независимое от канонического Wnt-сигналинга ингибирующее действие на процессы пролиферации кортикостероцитов при достижении надпочечником максимума своего развития. Воздействие ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах нарушает регуляцию PRH/Nhex пролиферативных процессов во всех зонах коркового вещества надпочечников.
7. Установлена экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex хромаффинными клетками мозгового вещества. В отличие от кортикостероцитов в хромаффинных клетках наблюдается связь между уровнем экспрессии PRH/Nhex и активацией канонического Wnt-сигналинга. Воздействие эндокринного дисраптора, начавшееся в пренатальном развитии, является фактором, нарушающим кооперацию в экспрессии PRH/Nhex и активации канонического Wnt-сигналинга.
8. Дисрапторное действие низких доз ДДТ на стероидогенез имеет избирательный характер и проявляется в нарушении секреции всех групп стероидных гормонов коркового вещества надпочечников. Основным механизмом дисрапторного действия ДДТ является воздействие на митохондрии кортикостероцитов, приводящее к их гибели, а также нарушение возрастной реорганизации митохондриального аппарата клеток как основного изменения секреторного потенциала кортикостероцитов. Кортикостероциты различных функциональных зон коркового вещества имеют различную чувствительность к действию дисраптора в пренатальном периоде развития.

9. Нарушение секреторной деятельности кортикостероцитов клубочковой зоны обусловлено ее дисморфогенезом и нарушением микроциркуляции, которые приводят к снижению стероидогенной активности клеток в пубертатном периоде, а после достижения половой зрелости – меньшей выраженностью процессов возрастной реорганизации митохондриального аппарата кортикостероцитов. Увеличение числа кортикостероцитов клубочковой зоны компенсирует их пониженную функциональную активность.

10. Изменения секреторной деятельности кортикостероцитов пучковой зоны обусловлены в большей степени длительностью воздействия дисраптора и в меньшей зависят от периода онтогенеза, в котором началось воздействие. В пубертатном периоде нарушения трофики и гибель клеток в наружной части пучковой зоны обуславливают реактивное усиление функциональной активности клеток в ее более глубоких участках. Основным изменением секреторного аппарата кортикостероцитов является увеличение числа митохондрий, что позволяет обеспечить необходимый уровень стероидогенеза при продолжающемся воздействии ДДТ. Возрастные изменения структурных характеристик секреторного процесса при воздействии ДДТ сохраняются и проявляются в большей степени.

11. Нарушение секреторной деятельности и ультраструктурные изменения кортикостероцитов сетчатой зоны имеют сходный механизм с таковыми в клубочковой зоне. В отличие от последней в сетчатой зоне увеличение числа митохондрий и объема цитоплазмы кортикостероцитов развивается быстрее. Увеличение продукции женских половых гормонов у самцов крыс после достижения половой зрелости обусловлены началом воздействия дисраптора в пренатальном периоде.

12. Воздействие ДДТ на развивающийся организм вызывает нарушение продукции катехоламинов, более выраженное по продолжительности, чем стероидных гормонов. Оно обусловлено отставанием в развитии мозгового веще-

ства и нарушением структуры митохондрий хромаффинных клеток. Это приводит к снижению выделения ими секреторных продуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы / А.Г. Бабаева – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 336с.
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПин 2.3.2.1078-01. – 2008.
3. Гордиенко В.М. Ультраструктура желез эндокринной системы / В. М. Гордиенко, В.Г. Козырицкий – Киев: «Здоров'я», 1978. – 288с.
4. ДДТ и его производные. Совместное издание Программы ООН по окружающей среде и Всемирной организации здравоохранения. М.: Медицина, 1982. – 216с.
5. Кемоклидзе К.Г. Постнатальный рост мозгового вещества надпочечника крысы / Кемоклидзе Г. К. // Морфология. – 1998. – Т.113. – № 3. – С. 57.
6. Лушникова Е.Л. Надпочечники: Ультраструктурная реорганизация при экстремальных воздействиях и старении / Е.Л. Лушникова, Л.М. Непомнящих, Е.В. Колдышева, О.П. Молодых – М.: Изд. РАМН, 2009. – 336с.
7. Сапин М. Р. Сосуды надпочечных желез / М. Р. Сапин – М.: Медицина, 1974. – 208с.
8. Следнева Ю.П. Изменения ультраструктуры фолликулярных эпителиоцитов щитовидной железы крыс в пубертатном периоде, обусловленные длительным воздействием низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана / Ю.П. Следнева, Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 113-118.
9. Смиттен Н.А. Симпатоадреналовая система в фило- и онтогенезе позвоночных / Н.А. Смиттен. – М.: Наука, 1972. – 347 с.
10. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». – СПб: ГИОРД, 2015. – 176с.
11. Яглов В.В. Цитологическое и гистохимическое исследование секреторной деятельности хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечника / В.В. Яглов // Дисс. канд. мед. наук. – 1966. – 195с.

12. Яглова Н.В. Биология секреции тучных клеток / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 4. – С.4-10.
13. Яглова Н.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 12. – С. 720-722.
14. Яглова Н.В. Механизмы дисрапторного действия дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на функционирование фолликулярных эпителиоцитов щитовидной железы / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – № 8. – С. 196-199.
15. Яглова Н.В. Морфофункциональные изменения щитовидной железы крыс в пубертатном и постпубертатном периодах развития при воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана / Н.В. Яглова, Ю.П. Следнева, В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162. – № 8. – С.227-231.
16. Яглова Н.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155. – № 2. – С. 229-232.
17. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation / X. Zeng, et al. // Nature. – 2005. – V. 438. – P. 873-877.
18. A null mutation of Hhex results in abnormal cardiac development, defective vasculogenesis and elevated Vegfa levels / H. Hallaq et al. // Development. – 2004. – V. 131. – No. 20. – P. 5197-5209.
19. Adler P. N. Planar signaling and morphogenesis in Drosophila / P. N. Adler // Dev. Cell. – 2002. No. 2. – P. 525-535.
20. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective / C. Dreton, et al. // Mol. Cell. Endocrinol. – 2015. – V. 408. – P. 156-164.
21. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens / W. Van Weerden, et al. // Life Sciences. – 1992. – V. 50. – P. 857-861.

22. Adrenarche in the rat / D. Pignatelli, et al. // Journal of Endocrinology. – 2006. – V. 191. – No. 1. – P. 301-308.
23. Adrenocortical toxicity of 3-methylsulfonyl-DDE in mice / C.-J. Jonsson, et al. // Fundamental and Applied Toxicology. – 1991. – V. 16. – P. 365-374.
24. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells / B. D. Freedman, et al. // Dev. Cell. – 2013. – V. 26. – No. 6. – P. 666-673.
25. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling / M. Pihlajoki, et al. // Frontiers in Endocrinology. – 2015. – V. 6. – art. 27. – 14p.
26. Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice / S. Dalm, et al. // Neuroendocrinology. – 2005. – V. 81. – P. 372-380.
27. Age-related changes in the morphology and function of the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex / A. S. Belloni, et al. – 1992. – Tissue Cell. – V. 24. – P. 835-842.
28. Age-related differences in corticosterone secretion in female rats / M. J. Lo, et al. // Metabolism. – 1999. – V. 48. – P. 535-641.
29. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awakened rat / P. Garrido, et al. Neurobiol. Aging. – 2010. – V. 33. – No. 2. – P. 375-382.
30. Ahmed A. Immunohistochemical study of sustentacular cells in adrenal medulla of neonatal and adult rats using an antibody against S-100 protein / A. Ahmed // Folia Morphol. – 2017. – V. 76. No. 2. – P. 246-251.
31. Amoako P. K. Pesticides usage in cabbage (*Brassica oleracea*) cultivation in the forest ecozone of Ghana / P. K. Amoako, P. Kumah, F. Appiah // Int. J. Res. Chem. Environ. – 2012. – No. 2. – P. 26-31.
32. Anderson D. J. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids / Anderson D. J., Axel R. // Cell. – 1986. – V. 47. – P. 1079-1090.

33. Anderson D. J. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage / D.J. Anderson, J. F. Carnahan, A. Michelsohn, P. H. Patterson // *J. Neurosci.* – 1991. – V. 11. – P. 3507-3519.
34. Angers S. Proximal events in Wnt signal transduction / S. Angers, R. T. Moon // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – No. 10. – P. 468-477.
35. Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/beta- catenin and TGF-beta signalling pathways / A. M. Zorn, et al. // *Dev. Biol.* –1999. – V. 209. – No. 2. – P. 282-297.
36. Asp V. Adrenocortical toxicity of 3-methylsulphonyl-DDE; 3: studies in fetal and suckling mice / V. Asp, B. Lund, A. Bergman, I. Brandt // *Reproductive Toxicology.* – 1992. – V. 6. – P. 233-240.
37. Autoimmune diseases. 5Th edition. / N. Rose, I. Mackay ed. – Academic Press: 2014. – 1304p.
38. Azhar S. Effect of age on cholesterol uptake and utilization by rat adrenals: I. Internalization of lipoprotein-derived cholesterol esters / S. Azhar, E. Reaven // *Mech. Ageing Dev.* – 1994. – V. 77. – P. 13-25.
39. Bannwarth H. Structure and function of the stimulated adrenal cortex. I. Early changes of the nuclear volume in the adrenal cortex of the rat after ACTH / H. Bannwarth, O. V. Deimling, R. K. Rossner // *Beitr. Pathol.* – 1974. – V. 153. – P. 244-261.
40. Baum B. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling / B. Baum, M. Georgiou. – 2011. – *J. Cell Biol.* – V. 192. – P. 907-917.
41. Bazhanova E. D. Different pathways of neurohormonal hypothalamic control of the adrenal cortex function in young and old rats / E. D. Bazhanova, E. V. Chernigovskaya, O. A. Danilova // *Mech. Ageing Dev.* – 2009. – V. 118. – P. 91-102.
42. Becker J. WNT signaling, the development of the sympathoadrenal-paraganglionic system and neuroblastoma / J. Becker, Y. Wilting // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. – V. 75. – P. 1057-1070.

43. Bellingham M. Chemical Exposures During Pregnancy: Dealing with Potential, but Unproven, Risks to Child Health: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists / M. Bellingham, R. M. Sharp. – 2013. 7p.
44. Berthon A. Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development / A. Berthon, A. Martinez, J. Bertherat, P. Val // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2012. – V. 351. – P. 87-95.
45. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. / H. Aberle, et al. // *EMBO J*. – 1997. – V. 16. – P. 3797-3804.
46. Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells / V. Asp, et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2010. – V. 242. – P. 281-289.
47. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro / R. Machtinger et al. // *Human reproduction* . – 2013. – V. 28. – P. 2735-2745.
48. Blood vascular beds of rat adrenal and accessory adrenal glands, with special reference to the corticomedullary portal system: a further scanning electron microscopic study of corrosion casts and tissue specimens / T. Murakami, et al. // *Arch. Histol. Cytol.* – 1989. – V. 52. – P. 461-476.
49. Bouwman H. Transfer of DDT used in malaria control to infants via breast milk / H. Bouwman, P. J. Becker, R. M. Cooppan, A. J. Reinecke // *Bull. World Health Organ.* – 1992. – V. 70. – P. 241-250.
50. Brembeck F. H. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin / F. H. Brembeck, M. Rosario, W. Birchmeier // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2006. – V. 16. – P. 51-59.
51. Brock B.J. Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species / B. J. Brock, M. R. Waterman // *Biochemistry*. – 1999. – V. 38. – No. 5. – P. 1598-1606.

52. Bruder E. Oxygen-dependence of ACTH-stimulated aldosterone and corticosterone synthesis in the rat adrenal cortex: developmental aspects / E. Bruder, A. Nagler, H. Raff // *Journal of Endocrinology*. – 2002. – V. 172. – No. 3. – P. 595-604.
53. Buchanan J. B. Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice / J. B. Buchanan, N. L. Sparkman, J. Chen, R.W. Johnson // *Psychoneuroendocrinology*. – 2008. – V. 33. – P. 755-765.
54. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells / A. G. Garcia, et al. // *Physiol. Rev.* – 2006. – V. 86. – P. 1093-1131.
55. Camacho M. Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells / M. Camacho, J. D. Machado, J. Alvarez, R. Borges // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – P. 22383-22389.
56. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction / G. Davidson, et al. // *Nature*. – 2005. – V. 438. – P. 867-872.
57. Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenal / H. Sasano, et al. // *Mod. Pathol.* – 1995. – V. 8. – No. 1. – P. 11-17.
58. Chan W. From proliferation to target innervation: signaling molecules that direct sympathetic nervous system development / W. Chan, C. Anderson, D. Gonsalvez // *Cell Tissue Res.* – 2018. – V. 372. – No. 2. – P. 171-193.
59. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study / R. Frigerio, et al. // *Mov. Disord.* – 2006. – V. 21. – No. 10. – P. 1688-1692.
60. Cheng B. Diminished adrenal steroidogenic activity in aging rats: new evidence from adrenal cells cultured from young and aged normal and hypoxic animals / B. Cheng, I. A. Horst, S. L. Mader, J. Kowal // *Mol. Cell Endocrinol.* – 1990. – V. 73. – P. 7-12.
61. Chromaffin Granules in the Rat Adrenal Medulla Release Their Secretory Content in a Particulate Fashion / E. Crivellato, et al. // *Anat. Rec. Part A.* – 2004. – V. 277A. – P. 204–208.
62. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling and disease / H. Clevers, R. Nusse. – *Cell*. – 2012. – V. 149. – P. 1192-1205.

63. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th edition / J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss – Academic Press, 2008. – 928p.
64. Cochard P. Ontogenic appearance and disappearance of tyrosine hydroxylase and catecholamines in the rat embryo / P. Cochard, M. Goldstein, I. B. Black // *Neurobiology*. – 1978. – V. 75. – P. 2986-2990.
65. Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons / T. J. Hendershot, et al. // *Dev. Biol.* – 2008. – V. 319. – P. 179-191.
66. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism / C. Liu, et al. – *Cell*. – 2002. – V. 108. – P. 837-847.
67. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system / M. R. Hirsch, et al. // *Development*. – 1998. – V. 125. – P. 599-608.
68. Copeland F. Effects of o,p'-DDT on the adrenal gland and hepatic microsomal enzyme system of the beagle dog / F. Copeland, M. Cranmer // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1974. – V. 27. – P.1-10.
69. Could E. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death / E. Could, C. Woolley, B. McEwen // *J. Comp. Neurol.* – 1991. – V. 313. – No. 3. – P. 479-485.
70. Coupland R. Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla / R. Coupland // *J. Anat.* – 1965. – V. 99. – No. 2/ – P. 231-254.
71. Crivellato E. Granule changes of human and murine endocrine cells in the gastro-intestinal epithelia are characteristic of piecemeal degranulation / E. Crivellato, D. Ribatti, F. Mallardi, C.A. Beltrami // *Anat. Rec.* – 2002. – V. 268. – P. 353-359.
72. Cross-sectional study of a community with exceptional exposure to DDT / K. Kreiss, et al. // *JAMA*. – 1981. – V. 245. – P. 1926-1930.
73. Cueto C. Biological studies on an adrenocorticolytic agent and the isolation of the active components / C. Cueto, J. Brown // *Endocrinology*. – 1958. – V.62. – P.334-339.

74. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood : highlights from a national italian meeting / M. E., Street, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – P.1647.
75. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils / J. S. Erjefalt, et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1998. – V. 102. – P. 286-294.
76. Daniels D. L. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation / D. L. Daniels, W. I. Weis. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – V. 12. – P. 364-371.
77. Descamps A. Influence of aging on the sleep rebound induced by immobilization stress in the rat / A. Descamps, R. Cespuglio // *Brain Res.* – 2010. – V. 1335. – P. 14-23.
78. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex / F. Mitani, et al. // *Endocrinology.* – 1999. – V. 140. – No. 7. – P. 3342-3353.
79. Development of adrenal chromaffin cells in Sf1 heterozygous mice / J. Lohr, et al. // *Cell Tissue Res.* – 2006. – V. 325. – P.437-444.
80. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11b-hydroxylase / C. Wotus, et al. // *Endocrinology.* – 1998. – V. 139. – P. 4397-4403.
81. Development of chromaffin cells depends on MASH1 function / K. Huber, et al. // *Development.* – 2002. – V. 129. – P. 4729-4738.
82. Differences in CART expression and cell cycle behavior discriminate sympathetic neuroblast from chromaffin cell lineages in mouse sympathoadrenal cells / W. H. Chan, et al. // *Dev. Neurobiol.* – 2016. – V. 76. – P. 137-149.
83. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites / J. Hatcher, et al. // *Neurotoxicology.* – 2008. – V. 29. – No. 4. – P. 682-690.
84. DLK1 protein expression during mouse development provides new insights into its function / F. A. Falix, et al. // *ISRN Dev Biol.* – 2013. – Article ID 628962, 10 p

85. Domoto D. The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets / D. Domoto, J. Boyd, P. Mulrow, M. Kashgarian // *Am. J. Pathol.* – 1973. – V. 72. – P. 433-446.
86. Doupe A. J. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity / Doupe A. J., Landis S. C., Patterson P. H. // *J. Neurosci.* – 1985. – No. 5. – P. 2119-2142.
87. Dupouy J. P. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats / J. P. Dupouy, H. Coffigny, S. Magre J. *Endocrinol.* – 1975. – V. 65. – P. 347-352.
88. Dvorak A. M. Ultrastructural analysis of human basophil and mast cell recovery after secretion / A. M. Dvorak // *Semin. Clin. Immunol.* – 1994. – No. 8. – P. 5-16.
89. Early-life exposure to p,p'-DDT and p,p'-DDE in South African children participating in the VHEMBE study: An assessment using repeated serum measurements and pharmacokinetic modeling / M.-A. Verner, et al. // *Environment International.* – 2018. – V. 119. – P. 478-484.
90. ED and children health. Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health / World Health Organization, 2012. – 93p.
91. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine Disrupting Chemicals / A. Gore, et al. // *Endocrine Reviews.* – 2015. – V. 36. – 6. – P. E1-E150.
92. Effect of fasting on corticosterone production by zona fasciculate-reticularis cells in ovariectomized rats / L. L. Chang, et al. // *J. Investig. Med.* – 2002. – V. 50. – P. 86-94.
93. Effects of age, sex, and persistent organic pollutants on DNA methylation in children / K. Huen, et al. // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2013. – V. 55. – No. 3. – P. 209-222.
94. Effects of DDD on human adrenal. Attempted to use adrenal destructive agent in treatment of disseminated mammary and prostatic cancer / B. Zimmerman, H.

- Blohc, W. Williams, C. Hitchcock, B. Hoeischer // *Cancer*. – 1956. – No.9. – P.940-948.
95. El Wakil A. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer / A. El Wakil, E. Lalli // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2011. – V. 332. – P. 32-37.
96. Else T. Evaluation of telomere length maintenance mechanisms in adrenocortical carcinoma / T. Else, T. J. Giordano, G. D. Hammer // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 93. – P. 1442-1449.
97. Else T. Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia / T. Else, G. D. Hammer // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2005. – V. 16. – P. 458-468.
98. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society / R. T. Zoeller, et al. // *Endocrinology*. – 2012. – V. 153. – P. 4097-4110.
99. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement / E. Diamanti-Kandarakis, et al. // *Endocrine Rev.* – 2009. – V. 30. – P. 293-342.
100. Endothelial β -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Homeostasis / K. Tran, et al. // *Circulation*. – 2016. – V. 133. – No. 2. – P. 177-186.
101. Enucleation-Induced Rat Adrenal Gland Regeneration: Expression Profile of Selected Genes Involved in Control of Adrenocortical Cell Proliferation / M. Ty-czewska, et al. // *International Journal of Endocrinology*. – V. 2014. – Article ID 130359. – 13 pp.
102. Environment and human exposure to persistent organic pollutants (POPs) in India: A systematic review of recent and historical data / B.M. Sharma, et al. *Environ. Int.* – 2014. – V. 66. – P. 48-64.
103. Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions / F. H. Brembeck, et al. // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18. – P. 2225-2230.
104. Exocytosis in adrenal chromaffin cells / R. D. Burgoyne, et al. // *J. Anat.* – 1993. – V. 183. – P. 309-314.

105. Expression of cytochromes P450_{11β} and P450_{17α} in rat adrenal gland during late gestational and neonatal stages / F. Mitani, et al. // *Steroids*. – 1997. – V. 62. – P. 57-61.
106. Fisher E. R. Ultrastructural features of aldosterone production / E. R. Fisher, B. Horvat // *Arch. Pathol.* – 1971. – V. 92. – P. 172-179.
107. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistochemical analysis of infiltrating lymphocytes / Y. Hayashi, et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1989. – V. 77. – No. 1. – P. 101-105.
108. Garcia-Sancho J. Mitochondria and chromaffin cell function / J. Garcia-Sancho, A. M. de Diego, A. G. Garcia // *Pflugers Arch.* – 2012. – V. 464. – P. 33-41.
109. Gaston K. Misregulation of the proline rich homeodomain (PRH/HHEX) protein in cancer cells and its consequences for tumour growth and invasion / K. Gaston, M.-A. Tsitsilianos, K. Wadey, P.-S. Jayaraman // *Cell Biosci.* – 2016. – V. 6. – 12p.
110. Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation / T. Moriguchi, et al. // *Development*. – 2006. – V. 133. – P. 3871-3881.
111. Gebremichael S. Organochlorine pesticide residues in human and cow's milk in the towns of Asendabo, Serbo and Jimma in South-Western Ethiopia / S. Gebremichael, T. Birhanu, D. A. Tessema // *Chemosphere*. – 2013. – V. 90. – P. 1652-1657.
112. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases / H. Van den Berg, et al. // *Environ. Health Perspect.* – 2012. – V. 120. – P. 577-582.
113. Grigoryan T. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of β-catenin in mice / T. Grigoryan, P. Wend, A. Klaus, W. Birchmeier // *Genes Dev.* – 2008. – V. 22. – No. 17. – P. 2308-2341.
114. Gruenwald P. Embryonic and postnatal development of the adrenal cortex, particularly the zona glomerulosa and accessory nodules / P. Gruenwald // *Anat. Rec.* – 1946. – V. 95. – P. 391-421.

115. Gumbiner B. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex / B. Gumbiner, B. Stevenson, A. Grimaldi // *J. Cell Biol.* – 1988. – V. 107. – P. 1575-1587.
116. Harris M. L. Lineage specification in neural crest cell pathfinding / M. L. Harris, C. A. Erickson // *Dev. Dyn.* – 2007. – V. 236. – No. 1. – P. 1-19.
117. Hartman D. Neurophysiological Toxicology: Identification and Assessment of Human Neurotoxic syndromes. 2nd edition. / D. Hartman – New York: Springer Science+Business Media, 1995. – 266p.
118. Hhex is a direct repressor of endothelial cell-specific molecule 1 (ESM-1) / R. Cong et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 346. – No. 2. – P. 535-545.
119. Hippocampal corticosteroid receptor mRNA expression and spatial learning in the aged Wistar rat / J. L. Yau, et al. // *Brain Res.* – 1994. – V. 657. – P. 59-64.
120. Holzwarth M. Evidence for fibroblast growth factor mediation of compensatory adrenocortical proliferation / M. Holzwarth // *Endocr. Res.* – 1995. – V. 21. – No. 1-2. – P. 115-119.
121. Hormones of the adrenal cortex. 6Th edition / D. Kufe, R. Pollock, R. Weichselbaum, et al. eds. – Holland- Frei Cancer Medicine. Bc. Decker Inc., 2003.
122. Huber K. Segregation of neuronal and neuroendocrine differentiation in the sympathoadrenal lineage / K. Huber // *Cell Tissue Res.* – 2015. – V. 359. – P. 333-341.
123. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives / K. Huber // *Dev. Biol.* – 2006. – V. 298. – P. 335-343.
124. Huber K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest / K. Huber, C. Kalcheim, K. Unsicker // *Auton. Neurosci.* – 2009. – V. 151. – P.10-16.
125. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling / H. Yamazaki, et al. // *Journal of health science.* – 2010. – V. 56. – No. 5. – P. 566-575.

126. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1 / O. Hatano, et al. // *Genes Cells*. – 1996. – V. 1. – No. 7. – P. 663-671.
127. Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells / M. R. Crompton, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – P. 5661-5667.
128. Ikeda Y. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases / Y. Ikeda, W. Shen, H. Ingraham, K. Parker // *Mol. Endocrinol.* – 1994. – V. 8. – No. 5. – P. 654-662.
129. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17) in rat adrenal cortex and gonads / G. Pelletier, et al. // *Journal of Endocrinology*. – 2001. – V. 171. – P. 373-383.
130. Inactivation of the β -catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development / V. Brault et al. – 2001. – *Development*. – V. 128. – P. 1253-1264.
131. Instructive role of Wnt/ β -catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells / H. Y. Lee, et al. // *Science*. – 2004. – V. 303. – P. 1020-1023.
132. IPCS Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors // Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.– 2012. 180p.
133. Insm1 (IA-1) is a crucial component of the transcriptional network that controls differentiation of the sympatho-adrenal lineage / H. Wildner, et al. // *Development*. – 2008. – V. 135. – P. 473–481.
134. Jaga K. Global surveillance of DDTand DDE levels in human tissues / K. Jaga, C. Dharmani // *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. – 2003. – V. 16. – No. 1. – P. 7-20.
- 135. Janjua M. Age related changes in the rat adrenal cortex / M. Janjua, M. Khan // *Journal of the Pakistan Medical Association*. – 1992. – V. 42. – No. 4. – P. 89-94.**
136. Jonsson C.-J. In vitro bioactivation of the environmental pollutant 3-methylsulphonyl-2,2-bis(4-chlorophenyl)- 1,1 -dichloroethene in the human adrenal

- gland / C.-J. Jonsson, B.-O. Lund // *Toxicology Letters*. – 1994. – V. 71. – P.169-175.
137. Jonsson C.-J. Transplacental toxicity of 3-methylsulfonyl-DDE in the developing adrenal cortex in mice / C.-J. Jonsson, H. Rodriguez-Martinez, I. Brandt // *Reproductive Toxicology*. – 1995. – V. 9. – No. 3. – P. 257-264.
138. Kadioglu D. The pleomorphism of mitochondria in the rat adrenal cortex / D. Kadioglu, R. G. Harrison // *Journal of Endocrinology*. – 1972. – V. 52. – P. 203-204.
139. Kameda Y. Signaling molecules and transcription factors involved in the development of the sympathetic nervous system, with special emphasis on the superior cervical ganglion / Y. Kameda // *Cell Tissue Res*. – 2014. – V. 357. – P. 527-548.
140. Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network / M. Katoh // *Clin. Cancer Res*. – 2007. – V. 13. – No. 14. – P. 4042-4045.
141. Kim A. C. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances / A. C. Kim, G.D. Hammer // *Mol. Cell. Endocrinol*. – 2007. – V. 265-266. – P. 10-16.
142. King P. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages / P. King, A. Paul, E. Laufer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – No. 50. – P. 21185-211890.
143. Laborda J. The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation / J. Laborda // *Histol. Histopathol*. – 2000. – V. 15. – P.119-129.
144. Landis S. C. Neural crest cell lineages / S. C. Landis, P. H. Patterson // *Trends Neurosci*. – 1981. – No. 4. – P.172-175.
145. Lau C. Regulation of adrenal chromaffin cell development by the central monoaminergic system: Different control of norepinephrine and epinephrine levels and secretory responses / C. Lau, L. L. Ross, W. L. Whitmore, T. A. Slotkin // *Neuroscience*. – 1987. – V. 22. – P. 1067-1075.
146. Lindhe O. Cytochrome P450-Catalyzed Binding of 3-Methylsulfonyl-DDE and o,p_-DDD in Human Adrenal Zona Fasciculata/Reticularis / O. Lindhe, B. Scogseit, I. Brandt // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2002. – V. 87. – No. 3. – P. 1319-1326.

147. Lineage-specific requirements of β -catenin in neural crest development / L. Hari, et al. // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 159. – P. 867-880.
148. Lo M. J. Aging effects on the secretion of corticosterone in male rats / M. J. Lo, K. K. Kau, W. L. Cho, P. S.Wang // *J. Investig. Med.* – 2000. – V. 48. – P. 335-342.
149. Lo M. J. Effect of aging on corticosterone secretion in diestrous rats / M. J. Lo, K. K. Kau, P. S.Wang // *J. Cell. Biochem.* – 2006. – V. 97. – P. 351-355.
150. Lo M. J. Effects of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats / M. J. Lo, L. L. Chang, P. S.Wang // *J. Cell. Biochem.* – 2000. – V. 77. – P. 560-568.
151. Lo M. J. Involvement of cAMP but not PKA in the increase of corticosterone secretion in rat zona fasciculata-reticularis cells by aging / M. J. Lo, P. S.Wang // *J. Cell. Biochem.* – 2002. – V. 85. – P. 35-41.
152. Longnecker M. P. Invited Commentary: Why DDT matters now / M. P. Longnecker // *American Journal of Epidemiology.* – 2005. – V. 162. – P. 726-728.
153. Lund B. O. Metabolic activation and toxicity of a DDT-metabolite, 3-methylsulphonyl-DDE, in the adrenal zona fasciculata in mice / B. O. Lund, A. Bergman, I. Brandt // *Chem-Biol. Interact.* – 1988. – V. 65. – P. 25-40.
154. Lund B. O. Novel Involvement of a Mitochondrial Steroid Hydroxylase (P450c11) in Xenobiotic Metabolism / B.-O. Lund, J. Lund // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – No. 36. – P. 20895-20897.
155. Luo X. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation / X. Luo, Y. Ikeda, K.L. Parker // *Cell.* – 1994. – V. 77. – No. 4. – P. 481-490.
156. Macdonald R. W. Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data / R. W. Macdonald, T. Harner, J. Fyfe // *Science of the Total Environment* . – 2005. – V. 342. – P. 5-86.
157. Magalhaes M. A stereologic study of the effects of metapirone on the rat adrenal // M. C. Magalhaes, M. M. Magalhaes // *Laboratory Investigation.* – 1969. – V.21. – P. 491-496.

158. Martinez-Arguelles D. Mechanisms mediating environmental chemical-induced endocrine disruption in the adrenal gland / D. Martinez-Arguelles, V. Papadopoulos // *Frontiers in Endocrinology*. – 2015. – V. 6. – art. 29. – 12p.
159. McLin V. A. Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development / V.A. McLin, S. A. Rankin, A. M. Zorn // *Development*. – 2007. – V. 134. – No.12. – P. 2207-2217.
160. Mekonen S. Pesticide residue evaluation in major staple food items of Ethiopia using the Quechers method: A case study from the Jimma zone / S. Mekonen, A. Ambelu, P. Spanoghe // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2014. – V. 33. – No. 6. – P. 1294-1232.
161. Melting glaciers: a major source of persistent organochlorines to subalpine Bow Lake in Banff National Park, Canada / J. M. Blais, et al. // *Ambio*. – 2001. – V. 30. – P. 410-415.
162. Merry B. Mitochondrial structure in the rat adrenal cortex / B. Merry // *J. Anat.* – 1975. – V. 119. – No. 3. – P. 611-618.
163. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids / Y. Sadovsky, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1995. – V. 92. – No. 24. – P. 10939-10943.
164. Mitani F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance / F. Mitani, et al. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* – 2014. – V. 90. – P. 163-183.
165. Mitani F. Localization of P450 aldo and P450 11 beta in normal and regenerating rat adrenal cortex / F. Mitani, T. Ogishima, H. Miyamoto, Y. Ishimura // *Endocr. Res.* – 1995. – V. 21. – No. 1-2. – P. 413-423.
166. Mizuno T. Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats / T. Mizuno, F. Kimura // *Neurosci. Lett.* – 1997. – V. 222. – P. 49-52.

167. Morikawa Y. Hand2 determines the noradrenergic phenotype in the mouse sympathetic nervous system / Y. Morikawa, F. D'Autréaux, M. D. Gershon, P. Cserjesi // *Dev. Biol.* – 2007. – V. 307. – P. 114-126.
168. Mosimann C. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation / C. Mosimann, G. Hausmann, K. Basler // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – No. 10. – P. 276-286.
169. Mughal I. Some Histological Observations on Postnatal Growth of Rat Adrenal Gland with Advancing Age (A HRLM Study) / I. Mughal, A. Qureshi, M. Tahir // *Int. J. Agri. Biol.* – 2004. – V. 6. – No. 2. – P. 413-417.
170. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla / A. Furlan, et al. // *Science.* – 2017. – V. 357. – No. 4346. – eaal3753.
171. Nelson A. Adrenal cortical atrophy and liver damage produced in dogs by feeding 2,2-bis-(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD) / A. Nelson, G. Woodard // *Fed. Proc.* – 1948. – No.7. – P. 277.
172. Nussdorfer G. G.: Cytophysiology of the adrenal zona glomerulosa / G.G. Nussdorfer // *Int. Rev. Cytol.* – 1980. – V. 64. – P. 307-468.
173. Nussdorfer G.G. Long-term trophic effect of ACTH on rat adrenocortical cells: An ultrastructural, morphometric and autoradiographic study / G.G. Nussdorfer, G. Mazzocchi, L. Rebonato // *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* – 1971. – V. 113. – P. 30-43.
174. Odd-skipped related (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development / Q.Wang, et al. // *Dev. Biol.* – 2005. – V. 288. – P. 582-594.
175. Ozen S. Effects of Environmental Endocrine Disruptors on Pubertal Development / S. Ozen, S. Darcan // *J. Clin. Res. Ped. Endo.* – 2011. – V. 3. – No. 1. – P. 1-6.
176. Padgett D. A. Stress exacerbates age-related decrements in the immune response to an experimental in-fluenza viral infection / D. A. Padgett, R. C. MacCallum, J. F. Sheridan // *J. Gerontol. Biol. Sci.* – 1998. – V. 53A. –P. B347-353.

177. Pankratz D. S. The development of the suprarenal gland in the albino rat, with consideration of its possible relation to the origin of foetal movements / D. S. Pankratz // *Anat. Rec.* – 1931. – V. 49. – P.31-49.
178. PC12 cells differentiate into chromaffin cell-like phenotype in coculture with adrenal medullary endothelial cells / Y. Mizrachi, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87. – P. 6161-6165.
179. Perinatal changes in plasma and adrenal corticosterone and aldosterone concentrations in the mouse / M. Dalle, et al. // *J. Endocrinol.* – 1978. – V. 76. – P. 303-309.
180. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease / A. Ascherio, et al. // *Ann. Neurol.* – 2006. – V. 60. – P. 197-203.
181. Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways / S. Dager, et al. // *Development.* – 2003. – V. 130. – P. 6635-6642.
182. Plasmalemmal sodium-calcium exchanger shapes the calcium and exocytotic signals of chromaffin cells at physiological temperature / J. F. Padin et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2013. – V. 305. – P. 160-C172.
183. PRH/Hhex controls cell survival through coordinate transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor signaling / P. Noy, et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2010. – V. 30. – No. 9. – P. 2120-2134.
184. PRH/HHex inhibits the migration of breast and prostate epithelial cells through direct transcriptional regulation of Endoglin / R.M. Kershaw, et al. // *Oncogene.* – 2014. – V. 33. – No. 49. – P. 5592-5600.
185. Radke K. J. Age-related impairment of K(+)- and ACTH-stimulated aldosterone secretion by rat adrenal capsules / K. J. Radke // *Am. J. Physiol.* – 1993. – V. 264. – E82-89.
186. Ramakrishnan A.-B. Wnt target genes and where to find them / A.-B. Ramakrishnan, K. Cadigan // *F1000Res.* – 2017. – No. 6. – P. 746.

187. Reaven E. Effect of age on cholesterol uptake and utilization by rat adrenals: II. Lipoproteins from young and old rats / E. Reaven, L. Cao, S. Azhar // *Mech. Ageing Dev.* – 1994. – V. 77. – P. 27-41.
188. Ritter R. Assessment of nonoccupational exposure to DDT in the tropics and the north: relevance of uptake via inhalation from indoor residual spraying / R. Ritter, M. Scheringer, M. MacLeod, K. Hungerbuhler // *Environmental Health Perspectives.* – 2011. – V. 119. – P. 707-712.
189. Rogers D. J. The global spread of malaria in a future, warmer world / D. J. Rogers, S. E. Randolph // *Science.* – 2000. – V. 289. – P. 1763-1766.
190. Rohrer H. Transcriptional control of differentiation and neurogenesis in autonomic ganglia / H. Rohrer // *Eur. J. Neurosci.* – 2011. – V. 34. – P. 1563–1573.
191. Roop D., Hedgehog in Wntland / D. Roop, R. Toftgard // *Nat. Genet.* – 2008. – V. 40. – No. 9. – P. 1040-1041.
192. Roos T. B. Steroid synthesis in embryonic and fetal rat adrenal tissue / T. B. Roos // *Endocrinology.* – 1957. – V. 81. – P. 716-728.
193. Rosenthal M. J. Corticotropin releasing factor (CRF) and age-related differences in behavior of mice / M. J. Rosenthal, J. E. Morley // *Neurobiol. Aging.* – 1999. – No. 10. – P. 167-71.
194. Roy J. R. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans-a review / J. R. Roy, S. Chakraborty, T. R. Chakraborty // *Med. Sci. Monit.* – 2009. – V. 15. – No. 6. – P. 137-145.
195. Schimmer B. P. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease / B. P. Schimmer, P. C. White // *Mol. Endocrinol. Baltim.* – 2010. – MD 24. – P. 1322-1337.
196. Schulte D. M. Expression and spatio-temporal distribution of differentiation and proliferation markers during mouse adrenal development / D. M. Schulte, I. Shapiro, M. Reincke, F. Beuschlein // *Gene Expr. Patterns.* – 2007. – V. 7. – No. 1–2. – P. 72-81.

197. Stachowiak A. Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH- or dexamethasone-treated rats / A. Stachowiak, G. G. Nussdorfer, L. K. Malendowicz // *Histol. Histopathol.* – 1990. – V. 5. – No. 1. – P. 25-29.
198. State of the Science of Endocrine-Disrupting Chemicals. International Programme on Chemical Safety./ World Health Organization // Geneva: 2012. – 180p.
199. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein / C. B. Kallen, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – V. 41. – P. 26285-26288.
200. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development / K. L. Parker, et al., // *Recent Prog. Horm. Res.* – 2002. – V. 57. – P. 19-36.
201. Stuhlmiller T. J. Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction / T. J. Stuhlmiller, M. I. Garcia-Castro // *Cell Mol. Life Sci.* – 2012. – V. 69. – No. 22. – P. 3715-3737.
202. Synaptic protein and pan-neuronal gene expression and their regulation by Dicer-dependent mechanisms differ between neurons and neuroendocrine cells / J. Stubbusch, et al. // *Neural Dev.* – 2013. – V. 8. – P. 16.
203. Targeted disruption of beta-cateninin Sfl-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex / A. C. Kim, et al. // *Development.* – 2008. – V. 135. – No. 15. – P. 2593-2602.
204. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments / I. Souter, et al. // *Reproductive toxicology.* 2013. – V. 42. – P. 224-231.
205. The effects of ageing on the morphology and function of the zonae fasciculata and reticularis of the rat adrenal cortex / P. Rebuffat, et al. // *Cell. Tissue Res.* – 1992. – V. 270. – P. 265-272.
206. The exposure of fetuses and children to endocrine-disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement / N. E. Skakkebaek, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – V. 96. – P. 3056-3058.

207. The Gata3 transcription factor is required for the survival of embryonic and adult sympathetic neurons / K. Tsarovina, et al. // J. Neurosci. – 2010. – V. 30. – P. 10833-10843.
208. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation / J. Martine-Barbera, et al. // Development. – 2000. – V. 127. – No. 11. – P. 2433-2445.
209. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives / A. Pattyn, et al. // Nature. – 1999. – V. 399. – P. 366-370.
210. The LIM homeodomain transcription factor Islet-1 is required for the development of sympathetic neurons and adrenal chromaffin cells / K. Huber, et al. – 2013. – Dev. Biol. – V. 380. – P. 286-298.
211. The Pine River statement: human health consequences of DDT use / B. Eskenazi, et al. // Environ. Health Perspect. – 2009. – V. 117. – P. 1359-1367.
212. The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells / J. Villanueva, et al. // Journal of Cell Science. – 2014. – V. 127. – P. 5105-5114.
213. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living / J.M. Gorell, et al. // Neurology. – 1998. – V. 50. – P. 1346-1350.
214. The transcription factors AP-2 β and AP-2 α are required for survival of sympathetic progenitors and differentiated sympathetic neurons / M. Schmidt, et al. // Dev. Biol. – 2011. – V. 355. – P. 89-100.
215. The tumor suppressor HHEX inhibits axon growth when prematurely expressed in developing central nervous system neurons / M. Simpson, et al. // Mol. Cell Neurosci. – 2015. – V. 68. – P. 272-283.
216. The use of DDT in malaria vector control. WHO position statement / World Health Organization // Geneva: 2011. – 9p.
217. Tischler A. S. Chromaffin cell proliferation in the adult adrenal medulla / A. S. Tischler, L. A. Ruzicka, S. R. Donahue, R. A. DeLellis // Int. J. Dev. Neurosci. – 1989. – V. 7. – No. 5. – P.439-448.

218. Tischler A. S. The rat adrenal medulla I. The normal adrenal./ A. S. Tischler, R. A. DeLellis // J. Amer. Coll. Toxicol. – 1988. No. 7. – P. 1-21.
219. Tischler A. The rat adrenal medulla / A. Tischler // Toxicol. Pathol. – 1989. – V. 17. – No. 2. – P.330-332.
220. Tomlinson A. A quantitative analysis of rat adrenal chromaffin tissue. Morphometric analysis at tissue and cellular level correlated with catecholamine content / A. Tomlinson, J. Durbin, R. E. Coupland // Neuroscience. – 1987. – V. 20. – P. 895-904.
221. Topisirovic I. The proline rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth / I. Topisirovic, K. L. Borden // EMBO J. – 2003. – V. 22. – No. 3. – P. 689-703.
222. Ulrich-lai Y.M. Adrenal splanchnic innervations modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats / Y. M. Ulrich-lai, W.C. England // Neuroendocrinology. – 2002. – V. 76. – P. 79–92.
223. Uzumcu M. Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: gonadal effects and role in female reproduction / M. Uzumcu, A. M. Zama, E. Oruc // Reprod. Domest. Anim. – 2012. – V. 47. – Suppl 4. – P. 338-347.
224. Val P. Adrenal development is initiated by *cited2* and *Wt1* through modulation of *Sf-1* dosage / P. Val, J. P. Martinez-Barbera, A. Swain // Development. – 2007. – V. 134. – No. 12. – P. 2349-2358.
225. Val P. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues / P. Val, A. M. Lefrançois-Martinez, G. Veyssière, A. Martinez // Nuclear Receptor. – 2003. – V. 1. – No. 1. – 8p.
226. Val P. Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development / P. Val, A. Swain // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2010. – V. 323. – No. 1. – P. 105-114.
227. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta- galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells / S. D. Morley, et al. // Mol. Endocrinol. – 1996. – V. 10. – No. 5. – P. 585-598.

228. Verhofstad A. N. Immunohistochemical and biochemical study on the development of the noradrenaline and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat / A. N. Verhofstad, R. E. Coupland, T.R. Parker, M. Goldstein // *Cell Tis. Res.* – 1985. – V. 242. – P. 233-243.
229. Vinson G. P. Steroid 17-hydroxylation and androgen production by incubated rat adrenal tissue / G. P. Vinson, B. J. Whitehouse, C. Goddard // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* – 1978b. – No. 9. – P. 677-683.
230. Wakamatsu Y. Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis / Y. Wakamatsu, T. M. Maynard, J. A. Weston // *Development.* – 2000. – V. 127. – No. 13. – P. 2811-2821.
231. World Health Organization. Pesticide residues in food - 2016 evaluations. Part II - Toxicological. Geneva: WHO and FAO, 2017.
232. Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression / R. Alvarez-Medina, et al. // *Development.* – 2008. – V. 135. – No. 2. – P. 237-247.
233. Wnt-signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms / E. M. Walczak, et al. // *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* – 2014. – me20141060.
234. Wood M. A. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M.musculus* / M. A. Wood, A. Acharya, I. Finco, J. M. Swonger // *Development.* – 2013. – V. 140. – No. 22. – P. 4522-4532.
235. WT-1 is required for early kidney development / J. A. Kreidberg, et al. // *Cell.* – 1993. – V. 74. – No. 4. – P. 679-691.
236. Xing Y. Development of adrenal cortex zonation / Y. Xing, A. Lerario, W. Rainey, G. Hammer // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 2015. – V. 44. – No. 2. – P. 243-274.

237. Yamaguchi I. Plasma catecholamine and blood pressure responses to sympathetic stimulation in pithed rats / I. Yamaguchi, I. J. Kopin // *Am. J. Physiol.* – 1979. – V. 237. – P. H305.
238. Yarrington J. Toxic responses of the adrenal cortex / J. Yarrington, J. Latendresse, C. Capen // In: *Comprehensive Toxicology*, Sipes I., McQueen C., Gandol. A. (eds). – Oxford: Elsevier Science, 1996. – P. 637– 649.
239. Zaidi S. Impact of Aging on Steroid Hormone Biosynthesis and Secretion / S. Zaidi, W.-J. Shen, S. Azhar // *Open Longevity Science* – 2012. – No. 6. – P. 1-30.
240. β -catenin-independent regulation of Wnt target genes by RoR2 and ATF2/ATF4 in colon cancer cells / O. Voloshanenko, et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – Article number: 3178.
241. Yang O. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis / O. Yang, Kim H., Weon J., Y. Seo // *J. Cancer Prev.* – 2015. – V.20. – No. 1. – P. 2-24.
242. Zhang J. The diabetes gene Hhex maintains δ -cell differentiation and islet function/ J. Zhang, L. McKenna, C. Bogue, K. Kaestner // *Genes & Dev.* – 2014. – V. 28. –P. 829-834.
243. Zhu Z. Epigenetic programming and fetal metabolic programming / Z. Zhu, F. Cao, X. Li // *Front. Endocrinol.* – 2019. – V. 10. – Art. 764. – 15p.