

На правах рукописи

Цомартова Дибыхан Асланбековна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Яглова Наталья Валентиновна

Официальные оппоненты:

Стручко Глеб Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова»

Логвинов Сергей Валентинович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бельцевич Дмитрий Германович - доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий отделением онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (295007, Республика Крым, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4)

Защита состоится « _____ » _____ 2020г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте института www.morfolhum.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

А.М. Косырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Воздействие эндокринных дисрапторов – веществ антропогенного происхождения, нарушающих любые аспекты секреции и действия гормонов, является глобальной проблемой [Zoeller R. et al., 2012]. Увеличение числа заболеваний эндокринной и иммунной систем, особенно в детском возрасте, уменьшение возраста полового созревания, нарушения репродуктивной функции и увеличение частоты онкологических заболеваний указывают не только на роль генетических, но и эндокринных и антропогенных факторов [Ozen S. et al., 2011; WHO, 2012; Street M., et al., 2018].

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 [Gore et al., 2015; Verner M.-A. et al., 2018]. По данным мониторинга они выявляются в крови, моче, жировой ткани, а также в плаценте и пуповинной крови [International Programme on Chemical Safety, WHO, 2012.]. Наиболее распространенным на планете эндокринным дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), а самым частым источником его низкодозового воздействия – продукты питания [Jaga K. et al., 2003; WHO, 2012]. Это обусловлено как широким использованием ДДТ в 20-м, так и возобновившимся применением в 21-м веке [WHO, 2011].

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 [Diamanti-Kandarakis E. et al., 2009]. В первую очередь это фундаментальные исследования в области клеточной биологии, гистологии, эмбриологии и биохимии, направленные на изучение проявлений и механизма 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 онкологические 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 систем.

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 [Roy J.R. et al., 2009], а также дисрапторному

действию ДДТ на функционирование щитовидной железы [Яглова Н.В. и др., 2013; 2015]. 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 [Следнева Ю.П. и др., 2016; Яглова Н.В. и др., 2016], 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 [Yarrington J. et al., 1996]. 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 [Martinez-Arguelles D. et al., 2015] 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 исследования: 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 хромаффинных 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/Нhex пролиферативных процессов во всех зонах коркового вещества надпочечников и разобщающее действие ДДТ на кооперацию в экспрессии PRH/Нhex 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 период 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/Нhex 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 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), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), XXVII Международной конференции «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2019), 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 кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университета» 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/Hhex пролиферативных процессов в кортикостероцитах и хромаффинных клетках.
3. Воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии вызывает нарушение секреции всех видов стероидных гормонов надпочечников 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.).

Моделировали воздействие ДДТ, аналогичное воздействию на развивающийся организм человека, включая воздействие в течение внутриутробного периода, подсосного периода и потребления ДДТ при переходе на самостоятельное вскармливание. 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 потребляли раствор ДДТ вместо воды в течение всего срока беременности и 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 в утренние часы передозировкой золетилы в возрасте 42 суток и 70 суток. Таким образом, были сформированы 6 групп, названия которых и численность животных представлены в табл. 1.

Выбор сроков исследования обусловлен возрастной физиологией. 42-ые сутки соответствуют пубертатному периоду между адrenaрхе и гонадархе, когда в сетчатой зоне происходит синтез основного количества половых стероидов, так как активная секреция тестостерона, начинающаяся на 50-ые сутки, еще не наступила. 70-ые сутки – это постпубертатный период, когда надпочечник крысы достигает максимума своего морфологического и функционального развития [Pignatelly D., et al. 2006].

Обоснование и расчет потребленных доз ДДТ проводили с учетом соответствия количества ДДТ, потребляемого в сутки, при пересчете на объем циркулирующей крови, концентрации эндогенных гормонов; потребления ДДТ человеком с продуктами питания согласно нормативам Технического регламента Таможенного союза 021/2011; отличий метаболизма ДДТ в организме крысы и человека [Yamazaki H., et al., 2010].

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

Табл. 1.

Характеристика групп экспериментальных животных

№ п/п	Воздействие	Название группы	Кол-во животных
1.	Контрольные животные в возрасте 42-х сут.	P42	12
2.	Воздействие ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах до 42-х сут.	ДДТ E0-P42	12
3.	Воздействие ДДТ в постнатальном периоде до 42-х сут.	ДДТ P0-P42	12
4.	Контрольные животные в возрасте 70-ти сут.	P70	12
5.	Воздействие ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах до 70-х сут.	ДДТ E0-P70	12
6.	Воздействие ДДТ в постнатальном периоде до 70-х сут.	ДДТ P0-P70	12
Итого:		72	

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.

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

Изготовление гистологических препаратов надпочечников и светооптические исследования. Проводили двустороннюю адреналэктомия и забор крови из магистральных сосудов. Определяли массу тела животных и массу надпочечников. Надпочечники фиксировали в растворе Буэна. 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», морфометрические исследования препаратов надпочечников проводили по 28 параметрам методом с помощью программного обеспечения анализа изображений «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия).

Иммуногистохимические исследования. Выявление β -катенина в эндокриноцитах надпочечников проводили с помощью моноклональных антител («Cell Marque», США) в разведении 1:400. Подсчитывали количество кортикостероцитов и хромаффинных клеток (ХК) с мембранной, цитоплазматической и ядерной вариантами локализации β -катенина и выражали их в виде процентов от общего числа клеток в ПЗ и СЗ и мозговом веществе, и в виде абсолютного количества иммунопозитивных клеток в 1 мм^2 среза клубочковой зоны в связи с ее сложной трехмерной организацией. Активацию канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга, являющегося одним из ключевых регуляторов морфогенетических процессов, оценивали по накоплению β -катенина в цитоплазме и транслокации его в ядро [Berthon A., et al. 2012; Kim A., et al. 2008].

Для изучения экспрессии транскрипционного фактора PRH/Нhex, регулирующего пролиферацию клеток, использовали поликлональные антитела («Abcam» США) в разведении 1:8000. Подсчитывали количество иммунопозитивных клеток и выражали их в виде процентов от общего числа кортикостероцитов в пучковой (ПЗ) и сетчатой (СЗ) зонах, ХК, и в виде абсолютного количества позитивных кортикостероцитов в 1 мм^2 среза КЗ.

Для определения пролиферативной активности клеток использовали поликлональные антитела к Ki-67 («Cell Marque», США) в разведении 1:100. Количество Ki-67-позитивных клеток подсчитывали аналогичным способом. Для проявления иммунопероксидазной реакции использовали набор реактивов «UltraVision LP detection system» («ThermoFisher Scientific», США). Для контроля неспецифических реакций использовали срезы без нанесения первых антител. Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Электронномикроскопические исследования. Надпочечники фиксировали в 2,5% (объем/объем) растворе глutarового 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 эпона 812 и аралдита («Fluka», Германия). Полутонкие срезы изготавливали с помощью ультратома «PowerTomeX» («RMC Воескелер», США) и после обессмоливания окрашивали азуром II и эозином. После изучения их в световом микроскопе изготавливали ультратонкие срезы. Срезы контрастировали 2,5% раствором (масса/объем) цитрата свинца. Исследование проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии («Libra 120», «Carl Zeiss», Германия). На полученных цифровых электроннограммах проводили компьютерную ультраморфометрию.

Иммуноферментные исследования. Для оценки функциональной активности кортикостероцитов КЗ и ПЗ определяли концентрации альдостерона и кортикостерона в сыворотке крови методом ИФА с помощью наборов («Cusabio», Китай) и («IDS», США), соответственно. Функциональную оценку активности СЗ проводили с помощью определения

в сыворотке крови концентраций эстрадиола и эстрогена – конечных продуктов синтеза половых стероидов («DVC», США), с учетом крайне низкой секреции дигидротестостерон сульфата у крыс и возможного усиления ароматизации андрогенов. Также для оценки изменения стероидогенеза в сыворотке крови определяли концентрации прогестерона («DVC», США) и 17-оксипрогестерона («Monobind», США). Секрецию катехоламинов изучали по содержанию с ЭДТА-плазме крови адреналина и норадреналина, определяемых методом ИФА с помощью набора реактивов “CatCombi” (“IBL International”, Германия) с минимально определяемым содержанием адреналина 0,01 нг/мл и норадреналина 0,02 нг/мл. Функциональную активность ХК надпочечников оценивали по уровню адреналина в системном кровотоке [Xing Y., et al., 2015].

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 $<0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Пубертатный период

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития (ДДТ E0-P42), размеры и масса надпочечников были меньше контрольных значений (табл. 3). Соотношение коркового и мозгового вещества не отличалось от контрольных значений. В структуре коркового вещества был выявлен ряд изменений (табл. 3). КЗ была истончена, местами отсутствовала. Ее площадь была меньше контрольных значений. Встречались клетки с пикнотически измененными ядрами. Наблюдались расширение сосудов МЦР и стазы эритроцитов.

Промежуточная зона была более развита, чем у крыс контрольной группы. У 40% крыс в наружной части ПЗ выявлялись различные по размерам участки кровоизлияний, дистрофических изменений и гибели кортикостероцитов. У 60% крыс наблюдалось наличие участков регенерации в наружной части пучковой зоны с несформированной характерной структурой. Сосуды МЦР не были расширены. Площадь СЗ и количество клеток в 1мм^2 ее среза были существенно меньше контрольных значений. Кортикостероциты СЗ отличались более крупными размерами, в том числе и размерами ядер и более оксифильной цитоплазмой. Просветы сосудов как правило были свободны. Площадь мозгового вещества и общая площадь ХК в экваториальных срезах были меньше контрольных значений, но эти различия не достигали статистической значимости. Встречались ХК с пикнозом ядер. Кровенаполнение венозных синусоидов было неравномерным.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде развития (ДДТ Р0-Р42), абсолютная и относительная масса надпочечника были статистически значимо меньше контрольных значений (табл. 3). В отличие от группы ДДТ Е0-Р42 площадь КЗ не отличалась от значений контрольной группы. Кортикостероциты с повышенной оксифилией цитоплазмы и гиперхромазией ядер в КЗ встречались крайне редко. Расширения сосудов микроциркуляторного русла не выявлены. Отмечалось уменьшение площади, занимаемой промежуточной зоной по сравнению с контрольной группой и группой ДДТ Е0-Р42. В ПЗ различные по площади участки кровоизлияний, а также гибели клеток и регенерации встречались реже. Площадь ПЗ не отличалась от значений контрольной группы. Дистрофические изменения клеток ПЗ встречались у 25% крыс. У 12% крыс на границе СЗ и мозгового вещества также встречались участки кровоизлияний. При этом в ПЗ расширения капилляров и стаза форменных элементов не наблюдалось. Площадь СЗ надпочечников была статистически значимо меньше значений контрольной группы и соответствовала значениям группы ДДТ Е0-Р42. Однако в этой группе структура СЗ характеризовалась большей плотностью клеток, вследствие чего общее количество кортикостероцитов в срезе СЗ не отличалось от значений контрольной группы (табл. 3). Мозговое вещество в надпочечниках крыс группы ДДТ Р0-Р42 было хорошо выражено. Просветы синусоидов были заполнены плазмой и были свободны от форменных элементов. Большая часть ХК характеризовалась умеренной базофилией цитоплазмы. Клетки с пикнозом и гиперхромазией ядер встречались у 25% крыс. Таким образом, меньшие размеры надпочечников у крыс опытных групп в пубертатном периоде были обусловлены в основном меньшим развитием коркового вещества. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора с начала пренатального развития, они были обусловлены уменьшением КЗ и СЗ, а при воздействии с 1-го дня постнатального развития – в основном СЗ.

Табл. 3.

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

Показатели	Группы	ДДТ		
		Контрольная P42	E0-P42	P0-P42
Относительная масса надпочечника, %		0,008±0,0002	0,007±0,002*	0,007±0,0002*
Диаметр надпочечника, мкм		2670,30±67,81	2479,0±62,46*	2571,50±64,59
Толщина коркового вещества, мкм		897,75±23,31	840,27±30,25	797,38±19,91*
Площадь коркового вещества, мкм ²		4862960,0±135569,16	4592075,0±87674,04*	4566800,0±152972,2
Доля площади коркового вещества, %		87,87±0,91	87,70±0,96	86,66±0,97
Площадь мозгового вещества, мкм ²		666800,00±41557,37	623750,0±42364,37	702400,00±42471,60
Площадь КЗ, мкм ²		440006,00±25514,7	335587,50±26027,40*	432200,00±24282,00♦
Площадь ПЗ, мкм ²		2318394,00±154751,10	2421087,50±89626,70	2346720,00±164446,60
Площадь СЗ, мкм ²		2016960,00±98409,90	1750225,00±68586,70*	1757600,00±70216,50*
Площадь промежуточной зоны, мкм ²		87614,00±2062,9	96100,00±3738,30*	31200,00±2020,00*
Доля площади клубочковой зоны в корковом веществе, %		9,09±0,47	7,54±0,66*	9,54±0,58♦
Доля площади ПЗ в корковом веществе, %		47,77±2,87	53,36±1,97	49,91±0,42
Доля площади СЗ в корковом веществе, %		41,36±2,36	37,16±1,32*	39,66±2,18
Доля площади промежуточной зоны в корковом веществе, %		1,84±0,05	1,96±0,04*	0,90±0,04*♦
Количество кортикостероцитов в 1мм ² СЗ		6983,75±197,15	5653,00±192,85*	7650,00±115,85*♦
Общее количество кортикостероцитов в срезе СЗ		14085,94±704,30	9894,02±335,40*	13678,20±410,34♦
Диаметр капилляров КЗ, мкм		2,28±0,14	3,95±0,21*	2,29±0,07♦
Диаметр капилляров ПЗ, мкм		3,43±0,14	3,17±0,11	3,25±0,12
Диаметр капилляров СЗ, мкм		9,24±0,42	9,01±0,58	9,88±0,36
Общая площадь ХК в срезе мозгового вещества, мкм ²		501060,00±26642,15	476925,0±44580,04	536020,0±44879,5
Доля ХК 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.

Табл. 4.

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

Показатели	Группы	ДДТ		
	Контрольная P70	E0-P70	P0-P70	
Относительная масса надпочечника, %	0,0084± 0,0002	0,0074± 0,003*	0,0083± 0,0003♦#	
Диаметр надпочечника, мкм	2921,00±46,49#	2977,80±90,83#	2957,50±43,92#	
Толщина коркового вещества, мкм	999,50± 31,94#	1052,40± 56,25#	921,33± 19,56*♦#	
Площадь коркового вещества, мкм ²	5996000,00± 186714,45#	6509800,00± 333444,01#	5495700,00± 263766,67*♦#	
Доля площади коркового вещества, %	87,99±0,44	91,46±1,19*#	87,91±0,03♦	
Площадь мозгового вещества, мкм ²	812000,00± 8315,22#	598200,00± 45313,12*	757000,00± 41000,00♦	
Площадь КЗ, мкм ²	329900,00± 20561,27#	419260,00± 31902,50*#	462550,00± 83,33*	
Площадь ПЗ, мкм ²	3676250,00± 151469,26#	3676100,00± 200690,28#	3224600,00± 179000,00*#	
Площадь СЗ, мкм ²	1906000,00± 26079,55	2387400,00± 145585,96*#	1803000,00± 1030000,00♦	
Площадь промежуточной зоны, мкм ²	83850,00± 11395,63	27140,00± 5212,11*#	6050,00± 216,67*♦#	
Доля площади КЗ в корковом веществе, %	5,46±0,17#	6,45±0,43*	8,62±0,45*♦	
Доля площади ПЗ в корковом веществе, %	61,18±0,62#	56,61±1,34*	58,57±0,23*#	
Доля площади СЗ в корковом веществе, %	31,91±0,56#	36,58±0,98*	32,72±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 СЗ	7585,00± 330,81	5982,00± 154,64*	8070,00± 525,15♦	
Общее количество кортикостероцитов в срезе СЗ	14457,01± 1373,42	14281,43± 599,82#	14551,21± 945,76	
Диаметр капилляров КЗ, мкм	1,93±0,02#	2,14±0,10#	2,77±0,11*♦#	
Диаметр капилляров ПЗ, мкм	2,39±0,05#	3,33±0,16*	2,80±0,13*♦#	
Диаметр капилляров СЗ, мкм	12,33±0,35#	12,49±0,44#	10,97±0,37*♦#	
Общая площадь ХК в срезе мозгового вещества, мкм ²	578850,00± 21767,91#	394938,00± 46496,07*	544700,00± 19100,00♦	
Доля ХК 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.

Результаты исследования показывают, что пренатальное и постнатальное воздействия ДДТ не оказывают существенного влияния на формирование ПЗ. Эти данные представляют значительный интерес, так как при введении токсичных доз ДДТ у грызунов отмечались дистрофические и некротические изменения именно в ПЗ и отсутствие изменений в КЗ и СЗ [Asp V., et al., 1992; Jonsson S.-J., et al., 1995; Lund B., et al., 1988]. Следовательно, кортикостероциты ПЗ более чувствительны к токсическому действию ДДТ, а КЗ и СЗ – к дисрапторному. Морфологические и функциональные изменения в ПЗ, выявленные в пубертатном периоде, обусловлены гибелью кортикостероцитов вследствие нарушения микроциркуляции в наружной части коркового вещества. Это является морфологическим проявлением компенсации выявленного снижения продукции катехоламинов мозговым веществом (рис. 5), которое вызывает перераспределение венозного оттока из мозгового вещества через корковое благодаря анастомозам между МЦР для обеспечения глюконеогенеза в гепатоцитах [Сапин М.Р., 1974; Яглов В.В., 1966].

Постпубертатный период

К 70-му дню постнатального онтогенеза масса и размеры надпочечника крыс контрольной группы статистически значимо увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования. Соотношение коркового и мозгового вещества не изменялось. В корковом веществе соотношение КЗ, ПЗ и СЗ изменилось по сравнению с предыдущим сроком исследования за счет увеличения размеров ПЗ и уменьшения размеров КЗ. Доля площади ХК в мозговом веществе не изменилась (табл. 4).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития (ДДТ Е0-Р70), масса и размеры надпочечников также увеличились, но масса органа не достигла контрольных значений (табл. 4). Выявлено увеличение доли коркового вещества в надпочечнике по сравнению с контрольными значениями. Принципиальным отличием от контрольной группы было отсутствие возрастных изменений в структуре коркового вещества и сохранение соотношения КЗ, ПЗ и СЗ как в пубертатном возрасте (табл. 4). Наблюдалось восстановление целостности КЗ и увеличение ее размеров. Диаметр капилляров в КЗ значительно уменьшился по сравнению с предыдущим сроком исследования. Площадь промежуточной зоны уменьшилась и была в три раза меньше, чем в контрольной группе. Площадь ПЗ увеличилась в полтора раза по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовала значениям контрольной группы. Диаметр капилляров не уменьшался в отличие от крыс контрольной группы, встречались капилляры со стазом эритроцитов. У 50% животных в ПЗ выявлялись стаз эритроцитов в капиллярах и дистрофические изменения и гибель кортикостероцитов в этих участках. Наблюдались участки, представляющие собой скопления клеток без четко выраженной citoархитектоники, клеточного детрита в наружной части пучковой зоны без лейкоцитарной инфильтрации, в то время как в других участках ПЗ

обнаруживались скопления лейкоцитов в капиллярах, их экстравазация и лейкоцитарные (лимфоцитарные или лимфоцитарно-макрофагальные) инфильтраты, но в областях одиночной, а не фокальной гибели клеток. Появление лимфоцитарной инфильтрации в корковом веществе надпочечников при отсутствии явной аутоиммунной или эндокринной патологии было описано как у человека, так и у домашних животных, и рассматривалось как развитие латентного адrenalита [Rose N., et al., 2014; Hayashi Y., et al., 1989]. Это дает основание предположить, что гибель кортикостероцитов в ПЗ на более ранних сроках исследования могла стать причиной аутоиммунной реакции. Размеры СЗ увеличились более чем на треть по сравнению с предыдущим сроком и превысили значения контрольной группы. Диаметр капилляров также увеличился. Количество кортикостероцитов в 1мм² среза СЗ не изменялось и было меньше, чем в контрольной группе, но за счет увеличения площади СЗ их общее количество достигло контрольных значений. Меньшие размеры мозгового вещества были связаны с отставанием в развитии его паренхимы (табл. 4).

К 70-м суткам постнатального развития у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде онтогенеза (ДДТ P0-P70), размеры надпочечника увеличились (табл. 4). Постнатальный морфогенез характеризовался наименьшими темпами увеличения коркового и мозгового вещества в сравниваемых группах. Соотношение в надпочечнике коркового и мозгового вещества было аналогичным контрольному, но отличалось от группы ДДТ E0-P70 меньшей долей коркового вещества. В корковом веществе КЗ имела наибольшие размеры в сравниваемых группах. Но у большинства крыс отмечалась неравномерность ее толщины и даже очаговое отсутствие под капсулой. Диаметр капилляров был значительно больше, чем у крыс контрольной группы и группы ДДТ E0-P70. Промежуточная зона стала менее выраженной как по сравнению с предыдущим сроком исследования, так и с контрольной группой и группой ДДТ E0-P70. Увеличение площади ПЗ в постнатальном развитии, напротив, было наименьшим по сравнению с другими группами. У 70% крыс выявлены очаги кровоизлияний различной давности в наружной части ПЗ, о чем свидетельствовали скопления эритроцитов и теней эритроцитов, окруженных клеточным детритом. У 30% крыс встречались участки с дистрофическими изменениями клеток. Диаметр капилляров был больше значений контрольной группы, но меньше, чем у крыс группы ДДТ E0-P70. Выявлялись скопления лимфоцитов. СЗ также имела отличия в строении. Ее площадь в экваториальных срезах не изменялась по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовала значениям контрольной группы, но была меньше, чем в группе ДДТ E0-P70. Диаметр капилляров хотя и увеличился по сравнению с предыдущим сроком исследования, но имел наименьшее значение в сравниваемых группах. Количество клеток в срезах СЗ незначительно увеличилось и не имело отличий ни от контрольных значений, ни от значений группы ДДТ E0-P70. В единичных случаях в СЗ наблюдались

кровоизлияния, что также указывает на перераспределение венозного оттока от мозгового вещества. Площадь мозгового вещества и площадь ХК в срезе мозгового вещества соответствовали значениям контрольной группы и были статистически значимо большими, чем у крыс группы ДДТ Е0-Р70 (табл. 4). Среди ХК встречались пикнотически измененные клетки.

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

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

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

Экспрессия β -катенина кортикостероцитами у крыс контрольной группы выявлена во всех зонах коркового вещества. Встречались клетки как с мембранной и цитоплазматической локализацией белка, так и с транслокацией его в ядро, являющейся показателем активации канонического Wnt-сигналинга [Kim W., et al., 2013]. Преимущественно β -катенин локализовался на цитоплазматических мембранах. В пубертатном периоде клетки с транслоцированным в ядро β -катенином составляли четверть от экспрессирующих этот протеин кортикостероцитов в КЗ и шестую часть в ПЗ и СЗ. В постпубертатном периоде после достижения надпочечником его максимального развития численность клеток с мембранной локализацией β -катенина уменьшалась, а с ядерной локализацией оставалась неизменной во всех зонах (рис. 1). 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 КЗ [Berthon A., et al., 2012; Drelon C., et al., 2015; El Wakil A., et al., 2011]. Полученные данные указывают на поддержание в корковом

веществе определенного уровня активации Wnt-сигналинга в постнатальном развитии.

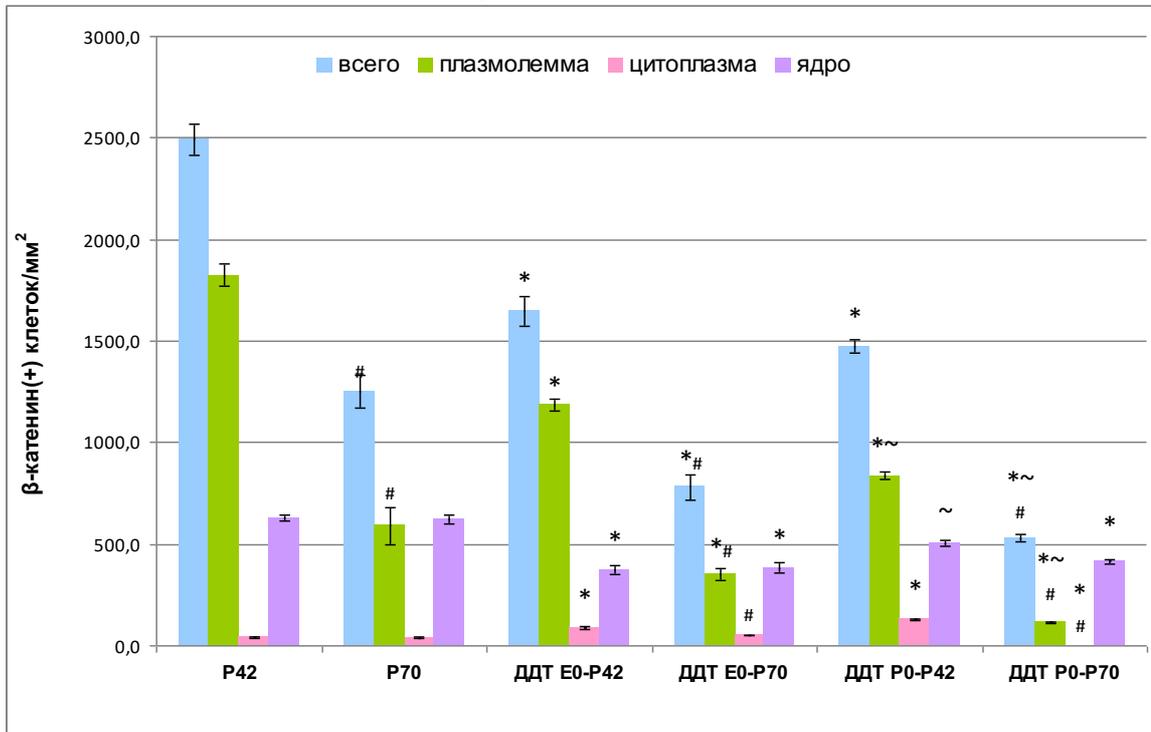
У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза, в пубертатном и в постпубертатном периодах количество кортикостероцитов КЗ с различной локализацией β -катенина было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе (рис. 1). Подавление Wnt-сигналинга на 42-е сутки объясняло отставание в развитии КЗ. Однако отмечалось и увеличение числа клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме, что является предшественником активации Wnt-сигналинга [El Wakil A. et al., 2011], которая вероятно и обусловила активное развитие КЗ после 42-х суток. Количество клеток с ядерной локализацией β -катенина не изменялось после наступления половой зрелости, как и у контрольных животных. В ПЗ отмечалось пропорциональное уменьшение клеток с ядерной, цитоплазматической и мембранной локализацией β -катенина, но в отличие от клубочковой зоны отмечалось уменьшение активации Wnt-сигналинга с возрастом (рис. 1). В участках регенерации ПЗ клетки с активацией Wnt-сигналинга не выявлялись. Полученные данные подтверждают имеющиеся единичные сведения, что активация канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга подавляет дифференцировку кортикостероцитов ПЗ, но при этом не обнаруживается в пролиферирующих клетках [Walczak E., et al., 2014]. Кортикостероциты СЗ характеризовались повышенной экспрессией β -катенина по сравнению с контролем на 42-е сутки, а на 70-е сутки различия были нивелированы. Так же, как и в КЗ, активация Wnt-сигналинга была подавлена в пубертатном и постпубертатном периодах (рис. 1). Таким образом, в отличие от КЗ гипоплазия СЗ сопровождалась увеличением процента клеток с мембранной локализацией β -катенина, а, следовательно, с усилением формирования межклеточных контактов. 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 СЗ, так и КЗ. Это стимулировало дальнейшее развитие СЗ, и после достижения половой зрелости наблюдалось ее увеличение, а не регресс. Таким образом, изменения активации β -катенина и морфологические изменения в постнатальном развитии СЗ и КЗ были аналогичными.

В пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном онтогенезе (ДДТ P0-P42), в КЗ количество β -катенин-позитивных клеток было статистически значимо меньшим, но параметры активации Wnt-сигналинга были выше (рис.). Эти данные подтверждают то, что низкий уровень активации Wnt-сигналинга у крыс группы ДДТ E0-P42 был причиной отставания у них развития КЗ. В ПЗ активация Wnt-сигналинга была подавлена и ее параметры уменьшались после достижения половой зрелости, как и в предыдущей группе. В СЗ коркового вещества процент β -катенин-позитивных кортикостероцитов с

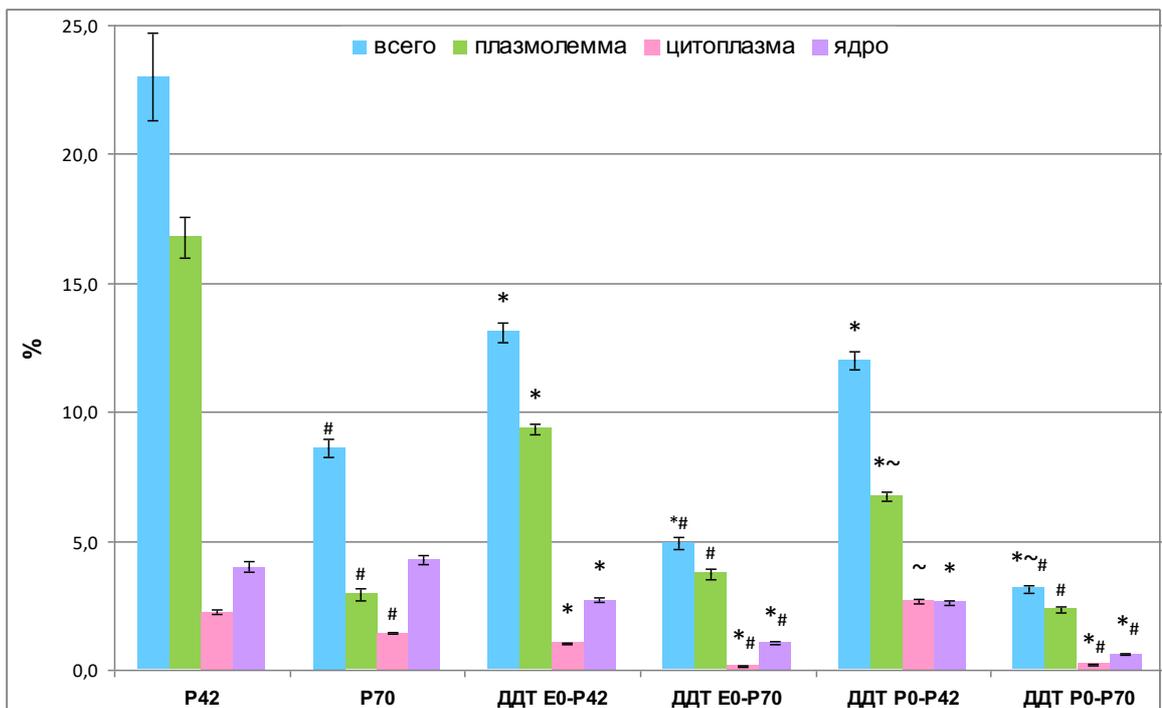
различной внутриклеточной локализацией был наименьшим в сравниваемых группах (рис. 1).

Исследование показало, что ХК надпочечников экспрессируют β -катенин в постнатальном этапе онтогенеза, и что развитие мозгового вещества сопровождается увеличением активации Wnt-сигналинга в ХК (рис. 1).

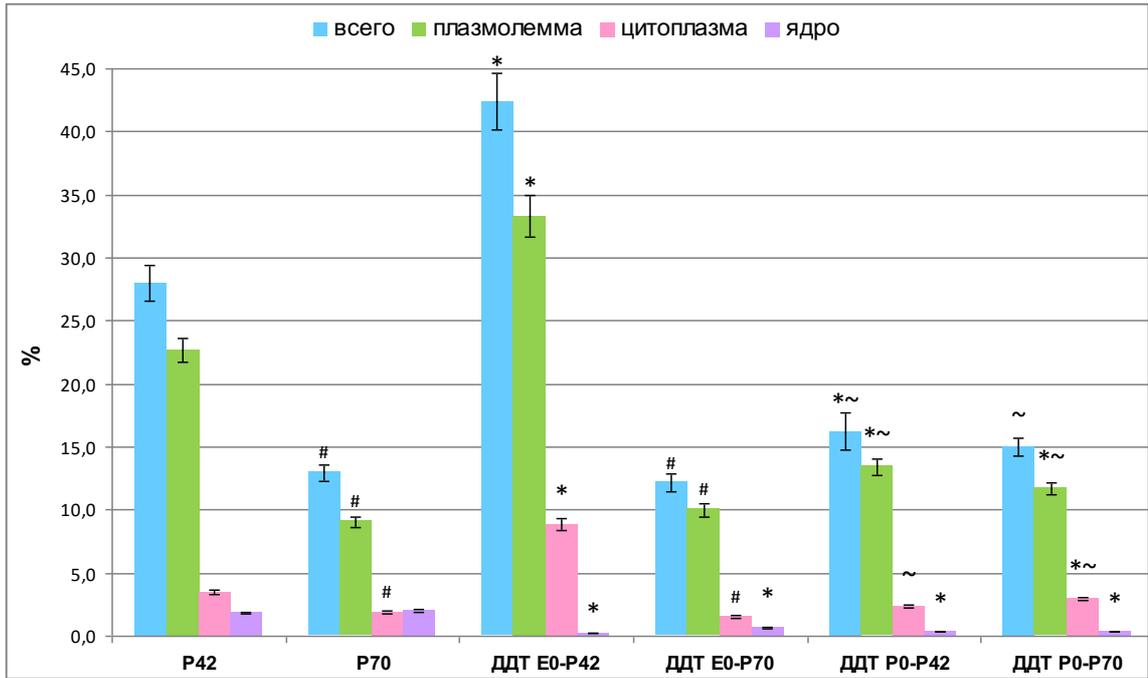
Клубочковая зона



Пучковая зона



Сетчатая зона



Мозговое вещество

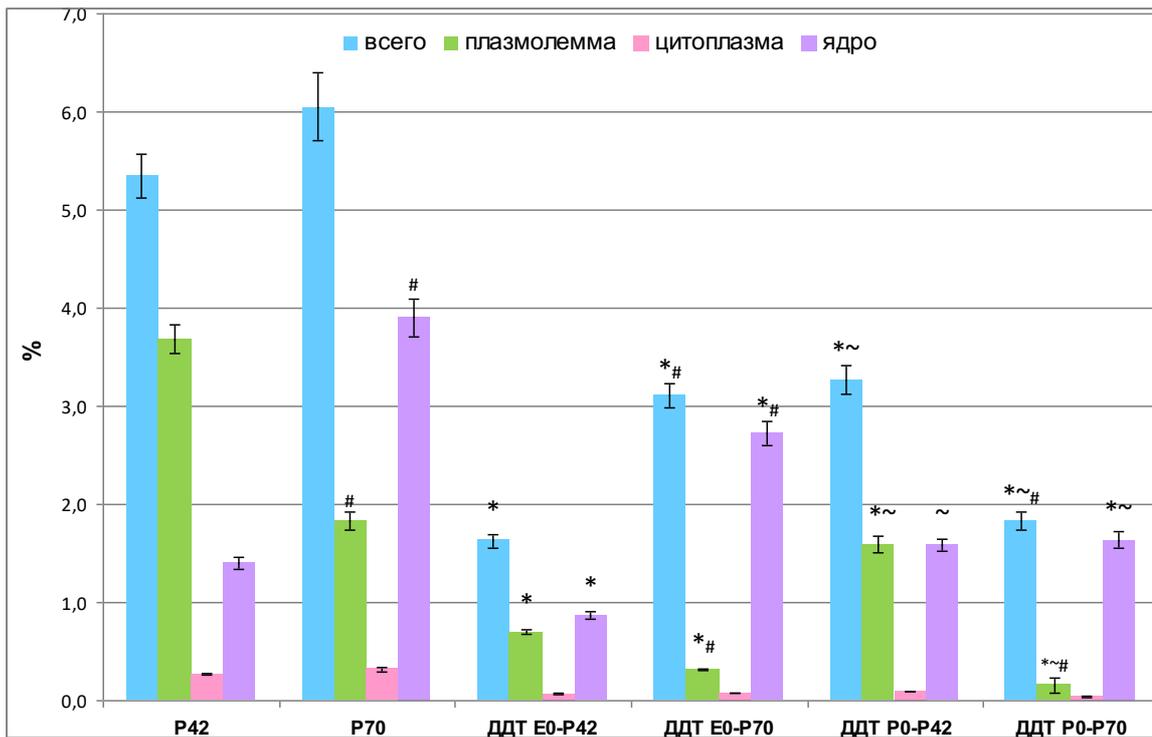


Рис. 1. Изменения общей численности β -катенин-позитивных кортикостероцитов и хромоаффинных клеток с различной субклеточной локализацией β -катенина в надпочечниках крыс в пубертатном (P42) и постпубертатном (P70) периодах у крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в течение пре- и постнатального развития и только постнатального развития ($M \pm m$).

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

Роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе мозгового вещества мало изучена. Накапливающиеся данные показывают, он играет роль в терминальной дифференцировке адренергических нейронов [Becker J., et al., 2018]. У крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию дисраптора в пубертатном периоде в мозговом веществе ХК отличались пониженной экспрессией β -катенина. Он выявлялся либо на цитоплазматических мембранах, либо в ядре. После достижения половой зрелости выявлено двукратное уменьшение доли β -катенин-позитивных ХК 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. По сравнению с возрастным контролем экспрессия β -катенина была пониженной. Таким образом, развитие мозгового вещества при воздействии эндокринного дисраптора в пре- и постнатальных периодах также сопровождалось увеличением активации Wnt-сигналинга, но пониженные параметры его активации могли обуславливать задержку развития мозгового вещества.

У крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ, в пубертатном периоде показатели активации Wnt-сигналинга соответствовали контрольным значениям, но после достижения половой зрелости усиления активации Wnt-сигналинга не наблюдалось в связи с ее более ранним увеличением, обеспечившим адекватную контрольную степень развития паренхимы мозгового вещества в пубертатном периоде. Сравнение изменений экспрессии β -катенина ХК и активации канонического Wnt-сигналинга 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 приводит к менее выраженному подавлению экспрессии β -катенина, а снижение активации Wnt-сигналинга появляется только после наступления половой зрелости. В научной литературе имеются данные, что в пренатальном периоде клетки-предшественники ХК мозгового вещества не экспрессируют рецепторы Wnt и Notch [Harris M., et al., 2007; Wakamatsu Y., et al., 2000]. Полученные нами данные показывают, что развитие Wnt-сигналинга в ХК может начинаться в конце пренатального периода.

Изменения пролиферативной активности эндокриноцитов надпочечников крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

У крыс контрольной группы в пубертатном периоде Ki-67-позитивные кортикостероциты выявлялись во всех зонах коркового вещества. На 70-ые сутки, когда развитие надпочечника достигает своего максимума, выявлено

закономерное уменьшение числа делящихся кортикостероцитов (рис. 2). В мозговом веществе возрастное снижение пролиферации ХК было менее выраженным (рис. 2).

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 КЗ и ПЗ. Общей чертой было снижение числа делящихся клеток в СЗ и мозговом веществе (рис. 2). На 70-ые сутки у крыс, развивавшихся в условиях пре- и постнатального воздействия ДДТ, отмечалось снижение пролиферативной активности, и число Ki-67-позитивные кортикостероцитов не отличалось от контрольных значений. У крыс, развивавшихся при постнатальном воздействии дисраптора, в КЗ пролиферативные процессы, напротив, усиливались. В мозговом веществе крыс обеих опытных групп пролиферация ХК в отличие от контроля повысилась (рис. 2).

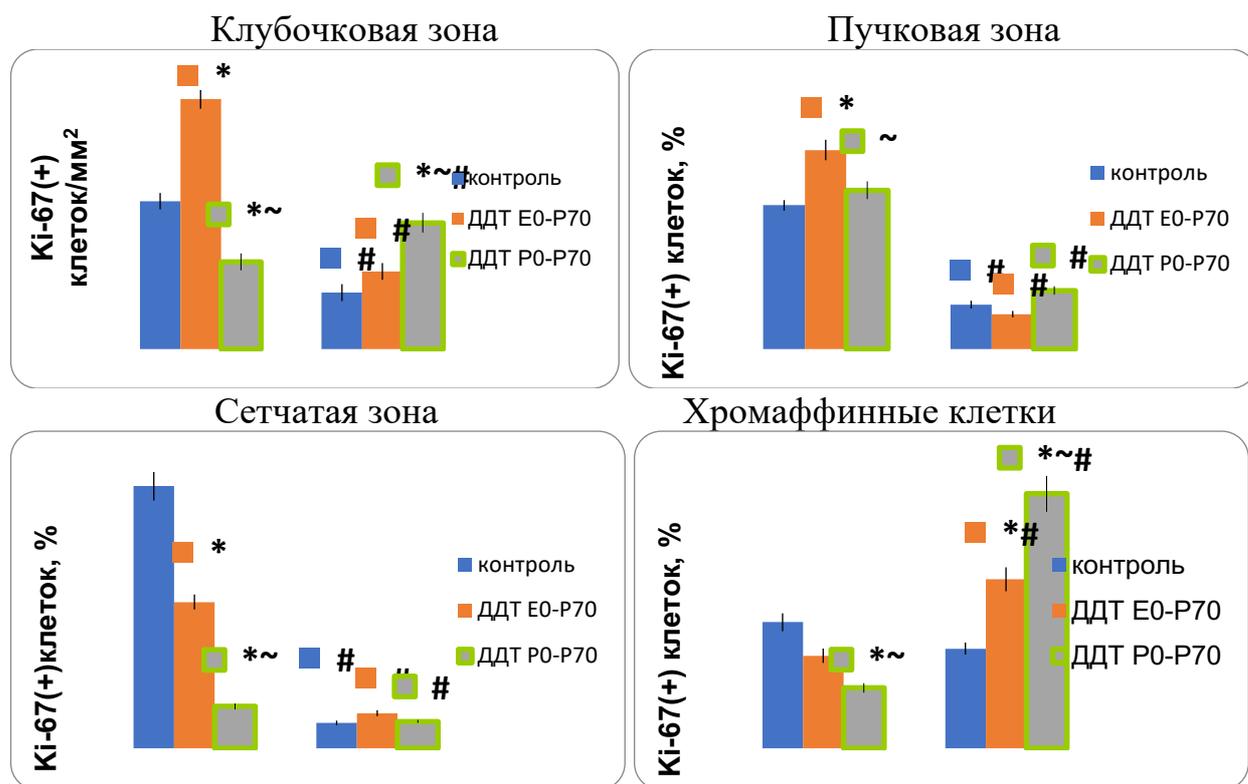


Рис. 2. Изменения численности Ki-67-позитивных эндокриноцитов коркового и мозгового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза ($M \pm m$)

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

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 наибольшая численность экспрессирующих PRH/Nhex клеток обнаруживалась в КЗ, в ПЗ их численность была существенно меньше, в СЗ они не выявлялись (рис. 3). У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза (ДДТ E0-P42), а также только в постнатальном периоде (ДДТ P0-P42) выявлено многократное увеличение численности PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в КЗ и особенно в ПЗ (рис. 3). В кортикостероцитах СЗ экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex не наблюдалась, как и в контроле (рис. 3).

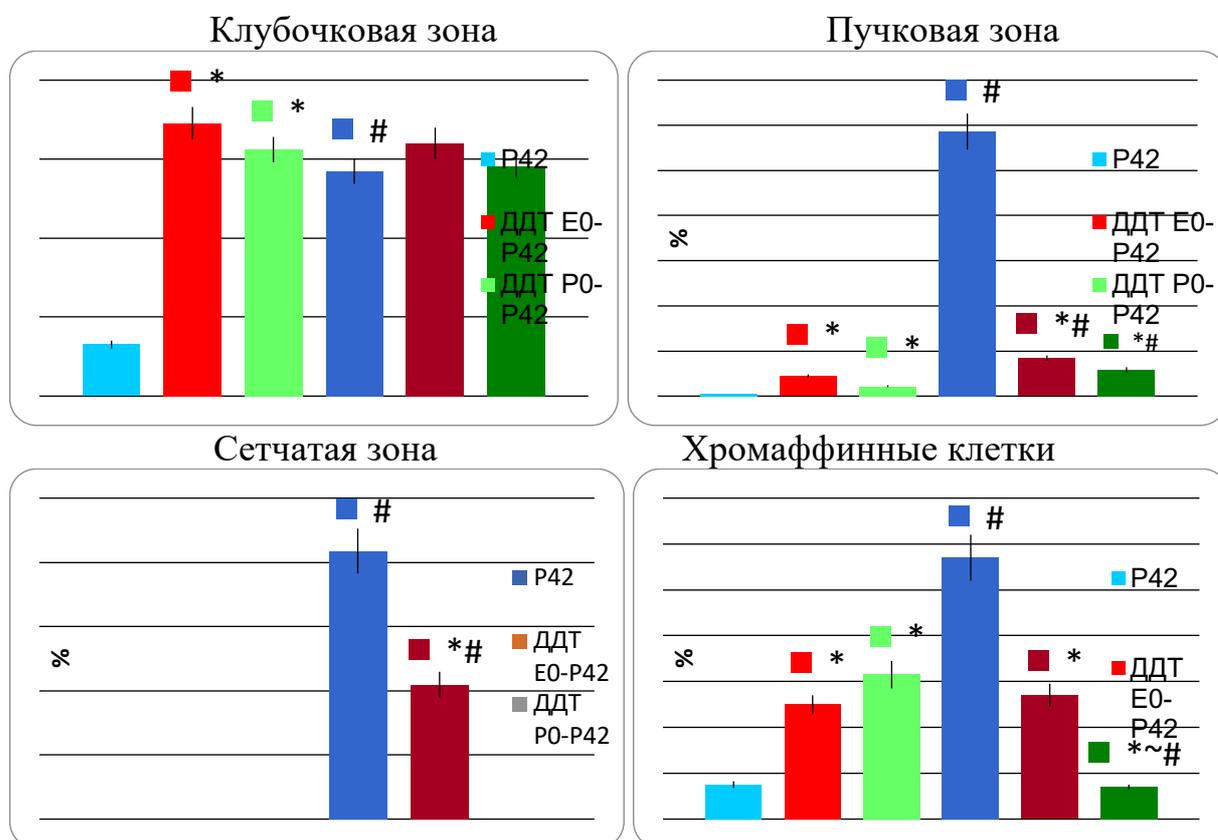


Рис. 3. Экспрессия транскрипционного фактора PRH/Nhex эндокриноцитами коркового и мозгового вещества (г) надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза (M±m)

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

На 70-ые сутки постнатального развития у крыс контрольной группы доля PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в КЗ и ПЗ коркового вещества значительно увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 3). В СЗ появились PRH/Nhex-позитивные клетки (рис. 3). У крыс группы ДДТ Е0-Р70 и ДДТ Р0-Р70 количество PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в единице площади КЗ существенно не изменялось по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовало значениям контрольной группы (рис. 3). Экспрессия PRH/Nhex кортикостероцитами в ПЗ увеличилась, но была значительно меньше контрольных значений (рис. 3). В СЗ у крыс группы ДДТ Е0-Р70 выявлены PRH/Nhex-позитивные кортикостероциты, но в меньших, чем в контроле количествах, а в группе ДДТ Р0-Р70 PRH/Nhex-позитивные отсутствовали.

В мозговом веществе крыс контрольной группы обнаружены немногочисленные PRH/Nhex-позитивные ХК в пубертатном и увеличение их численности в постпубертатном периоде. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, в пубертатном периоде процент PRH/Nhex-позитивных ХК был повышен, но после наступления половой зрелости не увеличивался в отличие от контроля, а в группе крыс ДДТ Р0-Р70 даже снижался (рис. 3). Известно, что производные краниальной части нервной трубки – нейроны головного мозга экспрессируют PRH/Nhex, в то время как производные ганглиозной пластинки – нейроны периферической нервной системы считались PRH/Nhex-негативными [Simpson M., et al., 2015]. Таким образом, впервые выявлена способность ХК экспрессировать транскрипционный фактор PRH/Nhex.

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 кортикостероцитов по сравнению с 42-ыми сутками. Анализ ассоциации выявил наличие высокой и средней степеней обратной зависимости между численностью Ki-67-позитивных и PRH/Nhex-позитивных кортикостероцитов в различных зонах коркового вещества (табл. 5). Таким образом, усиление экспрессии фактора Nhex в кортикостероцитах коркового вещества приводило к снижению их пролиферативной активности, как и других видах клеток [Topisirovic I., 2003].

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 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 ХК (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 ХК и его кооперацию с каноническим Wnt-сигналингом в постнатальном морфогенезе мозгового вещества.

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 воздействие 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

Группа	Контрольная	Пре- постнатальное и воздействие ДДТ	Постнатальное воздействие ДДТ
Показатель 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 E0-P42 повышение пролиферации кортикостероцитов КЗ 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. У крыс группы ДДТ P0-P70 напротив, с возрастом отмечалась активация пролиферативных процессов в КЗ, 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 ПЗ 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 КЗ, что свидетельствует о дисрапторном действии ДДТ. Снижение интенсивности пролиферативных процессов по мере развития органа у крыс группы ДДТ E0-P70 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 ПЗ. На 70-ые сутки очень низкая экспрессия Nhex и значительная супрессия канонического Wnt/ β -катенин сигналинга по сравнению с контролем не вызвала изменений показателя пролиферативной активности, что подчеркивает совместную роль этих факторов в регуляции развития ПЗ надпочечника. Снижение интенсивности пролиферации с возрастом также, как и в контрольной группе и группе ДДТ E0-P70 сопровождалось увеличением экспрессии PRH/Nhex (табл. 5), чему также способствовало подавление канонического Wnt/ β -катенин сигналинга как в группе ДДТ E0-P70.

В СЗ коркового вещества у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию ДДТ, 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 СЗ 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. Ингибирование 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 ХК 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 ХК 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 ХК

– один из возможных механизмов дисрапторного действия ДДТ в пренатальном периоде. 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 ХК, 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).

Таким образом, впервые 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/Nhex на пролиферативную активность ХК у животных контрольной группы. У животных опытных групп наблюдалось нарушение выявленной зависимости, особенно в корковом веществе у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пре- и постнатальном развитии.

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

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

В пубертатном возрасте у крыс выявлены изменения продукции всех классов стероидных гормонов надпочечников. При этом отмечались существенные отличия в зависимости от того, когда началось воздействие дисраптора. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, отмечалось снижение продукции минералокортикоидов и половых стероидов, и повышение глюкокортикоидов, также прогестерона и оксипрогестерона. У животных, подвергавшихся только постнатальному воздействию дисраптора, изменения были диаметрально противоположными, что свидетельствует о сложном, многоступенчатом механизме изменений стероидогенеза. После достижения половой зрелости у крыс нормализовывалась продукция только глюкокортикоидов. У крыс,

подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, более ярко было выражено антиандрогенное действие ДДТ, приводящее к увеличению продукции эстрадиола (рис. 4).

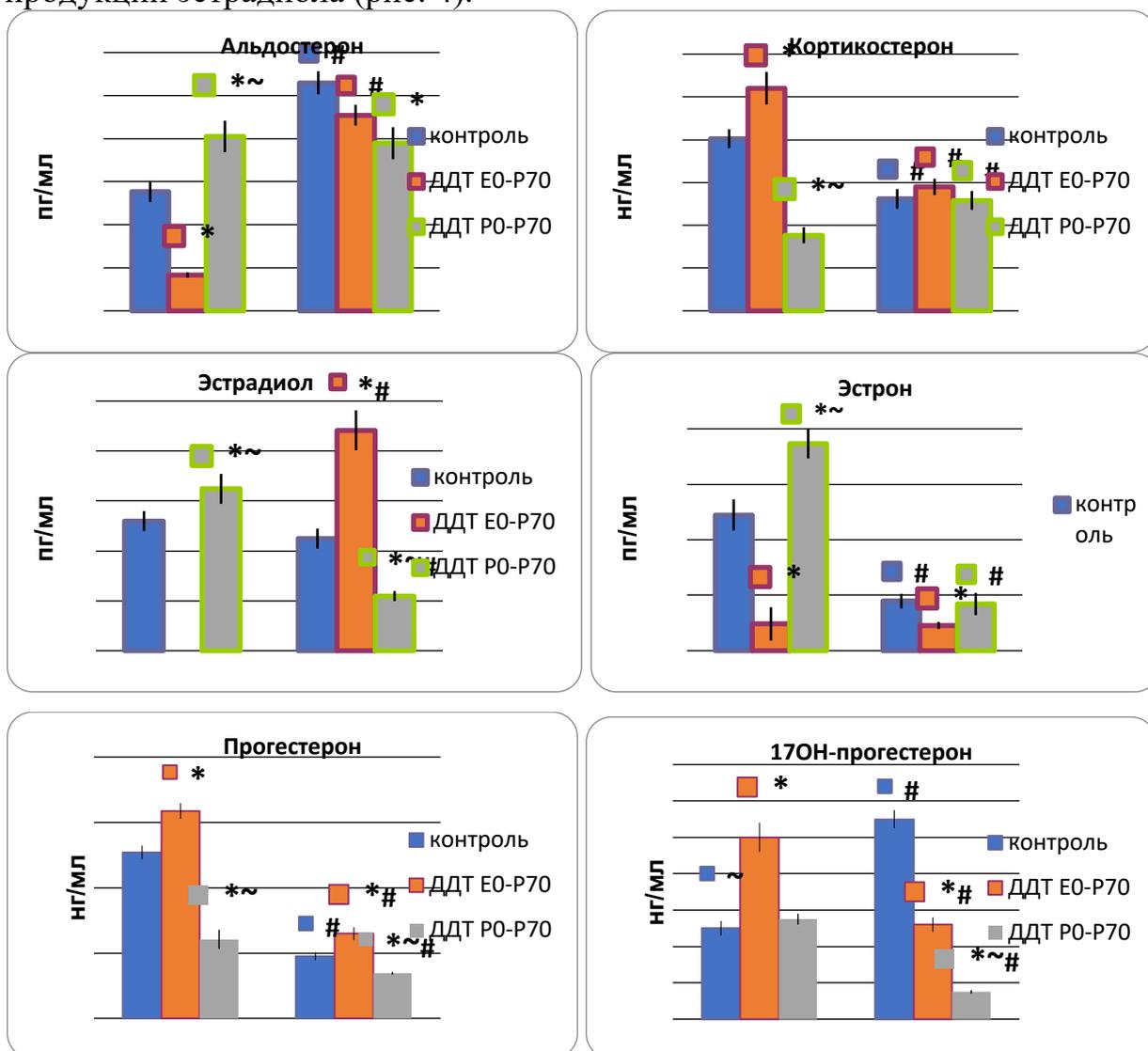


Рис. 4. Возрастные изменения продукции стероидных гормонов у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, с 42-ых по 70-ые сутки постнатального развития.

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

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

Изучение секреторных процессов в КЗ крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию, выявило в пубертатном периоде наличие

типичных признаков гипофункции: уменьшение размеров клеток, резкое увеличение липидных включений в цитоплазме, уменьшение процента митохондрий с отеком матрикса (табл. 7).

Табл. 7.

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

Периоды и показатели	Группы	ДДТ	
	Контрольная	Е0-Р42	Р0-Р42
<i>Пубертатный период</i>	Р42	Е0-Р42	Р0-Р42
Площадь кортикостероцита, мкм ²	94,67±2,99	78,67±0,95*	90,16±2,40♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	26,72±0,56	27,13±0,51	27,30±0,35
Диаметр митохондрий, мкм	0,99±0,03	1,06±0,02	0,99±0,03
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,36±0,01	0,32±0,01	0,72±0,03*♦
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	44,59±3,34	7,50±0,75*	68,33±2,08*♦
Доля площади липидов в цитоплазме, %	10,14±0,28	46,53±4,05*	0,72±0,04♦
Диаметр липидных включений, мкм	1,14±0,07	1,16±0,06	0,84±0,08*♦
<i>Постпубертатный период</i>	Р70	Е0-Р70	Р0-Р70
Площадь кортикостероцита, мкм ²	82,92±2,60#	82,49±2,24	75,41±1,80*♦#
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	27,01±0,11	26,57±0,40	26,62±0,31
Диаметр митохондрий, мкм	0,88±0,02#	0,94±0,02	1,03±0,05*
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,66±0,04#	0,47±0,03*#	0,33±0,02*#
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	30,22±1,03#	11,23±1,10*	2,63±0,20*#♦
Доля площади липидов в цитоплазме, %	18,72±0,15#	13,82±1,28*#	5,40±0,50♦
Диаметр липидных включений, мкм	1,41±0,06	1,36±0,04	1,51±0,13#

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия от групп ДДТ Е0-Р42 и Е0-Р70, # – от предыдущего срока исследования.

Следовательно, уменьшение продукции альдостерона у крыс было связано не только с недостаточным развитием КЗ, но и снижением стероидогенной активности кортикостероцитов, во многом обусловленной нарушениями микроциркуляции, приводящими к гипоксии, которая является известным фактором понижения функциональной активности кортикостероцитов КЗ [Bruder E., et al., 2002].

После достижения половой зрелости у крыс контрольной группы увеличение продукции альдостерона происходило на фоне уменьшения размеров КЗ. Это достигалось за счет реорганизации центрального звена

стероидогенеза – митохондриального аппарата, а именно замены крупных митохондрий на большее число митохондрий меньшего размера. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, перестройка митохондрий происходила медленнее, чем в контроле, поэтому, несмотря на активное развитие КЗ в постпубертатном периоде, уровень альдостерона не превысил контрольных значений. У крыс, получавших ДДТ с начала постнатального периода, реорганизация митохондрий происходила быстрее, еще в пубертатном периоде, что и обеспечило повышенную продукцию гормона с последующим ее снижением, обусловленным уменьшением числа митохондрий (табл. 7).

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов пучковой зоны

В пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, в ПЗ выявлены дистрофически измененные и гибнущие клетки, особенно в участках с нарушениями микроциркуляции. Регенерирующие участки ПЗ характеризовались наличием клеток с тонкой плазмолеммой и появлением признаков развития стероидогенной активности. В более глубоких участках ПЗ выявлено усиление как стероидогенной, так и белоксинтезирующей активности клеток. Главным изменением секреторного аппарата кортикостероцитов было большее число митохондрий, что позволяло обеспечить необходимый уровень стероидогенеза при продолжающемся воздействии ДДТ (табл. 8). У крыс, подвергавшихся только постнатальному воздействию дисраптора, также выявлялись дистрофически измененные клетки. Но секреторные процессы в целом, были выражены слабее (табл. 8). Возрастные изменения структурных характеристик секреторного процесса, такие как увеличение размеров клеток, укрупнение митохондрий у крыс, развивавшихся при пре- и постнатальном воздействии ДДТ, сохранялись и проявлялись в большей степени, а у крыс группы сравнения возрастные изменения ультраструктуры были слабо выражены. На 70-ые сутки постнатального развития ультраструктура кортикостероцитов ПЗ у крыс опытных групп отличалась по многим показателям как от контрольной группы, так и друг от друга. У крыс группы пренатального и постнатального воздействия ДДТ клетки имели большие размеры, более крупные ядра и митохондрии, большее число митохондрий в цитоплазме, в том числе и с отеком матрикса, более развитую ЭПС (табл. 8). У крыс группы постнатального воздействия, 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, комплекса Гольджи, усиление функционирования митохондрий.

Сопоставление ультраструктурных изменений кортикостероцитов и уровня кортикостерона в сыворотке крови указывает на подавление продукции гормона вследствие нарушений микроциркуляции и гибели

кортикостероцитов в наружной части ПЗ, а активация стероидогенеза осуществляется во внутреннем слое ПЗ 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.

Табл. 8.

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

Периоды и показатели	Группы	ДДТ	
	Контрольная	Е0-Р42	Р0-Р42
<i>Пубертатный период</i>	Р42	Е0-Р42	Р0-Р42
Площадь кортикостероцита, мкм ²	121,98±2,14	106,33±2,90*	114,70±2,67*
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	29,51±0,49	27,76±0,24*	28,63±0,50
Диаметр митохондрий, мкм	1,11±0,03	1,27±0,05*	1,35±0,03*
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,36±0,01	0,52±0,04*	0,35±0,05
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	53,62±3,34	63,90±5,75	78,58±5,79*
Доля площади липидов в цитоплазме, %	8,33±0,26	10,96±1,05	9,89±0,86
Диаметр липидных включений, мкм	1,14±0,08	1,80±0,09*	2,50±0,18*♦
<i>Постпубертатный период</i>	Р70	Е0-Р70	Р0-Р70
Площадь кортикостероцита, мкм ²	134,79±1,91#	151,57±3,75*#	121,09±6,14*♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	30,47±0,34	31,43±0,34*#	29,98±0,74♦
Диаметр митохондрий, мкм	1,32±0,05#	1,47±0,03*#	1,70±0,07*#♦
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,25±0,01#	0,34±0,02*#	0,21±0,02#♦
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	36,87±1,22#	61,11±3,10*	86,05±2,15*♦
Доля площади липидов в цитоплазме, %	14,77±0,15#	7,91±0,60*	8,70±0,05*
Диаметр липидных включений, мкм	1,58±0,08#	2,05±0,05*	1,94±0,07*#

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия от групп ДДТ Е0-Р42 и Е0-Р70, # – от предыдущего срока исследования.

Изменения ультраструктуры кортикостероцитов сетчатой зоны

У крыс группы пре- и постнатального воздействия ДДТ отмечалась невысокая стероидогенная активность кортикостероцитов СЗ. При этом клетки имели более крупные размеры, а количество митохондрий было значительно больше, чем в контроле.

Табл. 9.

Ультраструктурные изменения кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза (M±m)

Периоды и показатели	Группы	ДДТ	
	Контрольная	Е0-Р42	Р0-Р42
<i>Пубертатный период</i>	Р42	Е0-Р42	Р0-Р42
Площадь кортикостероцита, мкм ²	66,70±3,07	94,45±4,72*	71,85±2,08♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	22,00±0,51	24,51±0,46*	22,89±0,15♦
Диаметр митохондрий, мкм	1,58±0,04	1,26±0,02*	1,46±0,04♦
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,29±0,02	0,49±0,01*	0,25±0,01♦
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	95,77±1,22	93,06±1,26	92,17±1,32
Доля площади липидов в цитоплазме, %	6,89±0,46	5,41±0,36	10,35±0,78*♦
Диаметр липидных включений, мкм	2,64±0,12	1,71±0,15*	3,05±0,16♦
<i>Постпубертатный период</i>	Р70	Е0-Р70	Р0-Р70
Площадь кортикостероцита, мкм ²	58,91±1,42#	70,77±1,87*#	51,62±0,72*#♦
Площадь среза ядра кортикостероцита, мкм ²	21,60±0,29	22,93±0,47*#	19,56±0,42*#♦
Диаметр митохондрий, мкм	1,32±0,04#	1,34±0,03	1,26±0,03#
Количество митохондрий в мкм ² цитоплазмы	0,52±0,02#	0,53±0,04	0,57±0,04#
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	97,25±3,24	95,35±4,55	86,05±2,15*♦
Доля площади липидов в цитоплазме, %	3,11±0,12#	4,17±0,24*#	4,13±0,20*#
Диаметр липидных включений, мкм	3,67±0,18#	2,44±0,05*#	1,15±0,12*#♦

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы, ♦ – отличия от групп ДДТ Е0-Р42 и Е0-Р70, # – от предыдущего срока исследования.

У крыс группы постнатального воздействия ультраструктура кортикостероцитов СЗ была более близка к контрольным параметрам. Клетки демонстрировали высокую стероидогенную активность (табл. 9).

В контрольной группе после наступления половой зрелости кортикостероциты СЗ уменьшились в размерах. Выявлена структурная реорганизация митохондрий в виде увеличения численности и уменьшения размеров. Содержание липидов в цитоплазме также стало меньшим (табл. 9).

Пренатальное и постнатальное воздействие дисраптора обуславливало ускорение перестройки митохондрий как компенсацию замедлению развития СЗ (табл. 9). У крыс группы постнатального воздействия возрастные изменения были аналогичны контрольным и имели большую степень выраженности (табл. 9). В научной литературе имеются данные, что о,п-ДДД, являющийся метаболитом о,п-ДДТ, способен связываться с клетками СЗ, но не изменять продукцию половых стероидов [Lindhe O., et al., 2002]. Результаты настоящего исследования показывают способность низких доз ДДТ изменять и развитие СЗ, и структурное обеспечение секреторных процессов в ее клетках.

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

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

Воздействие ДДТ вызывало прогредиентное снижение адреналина и норадреналина в крови (рис. 5).

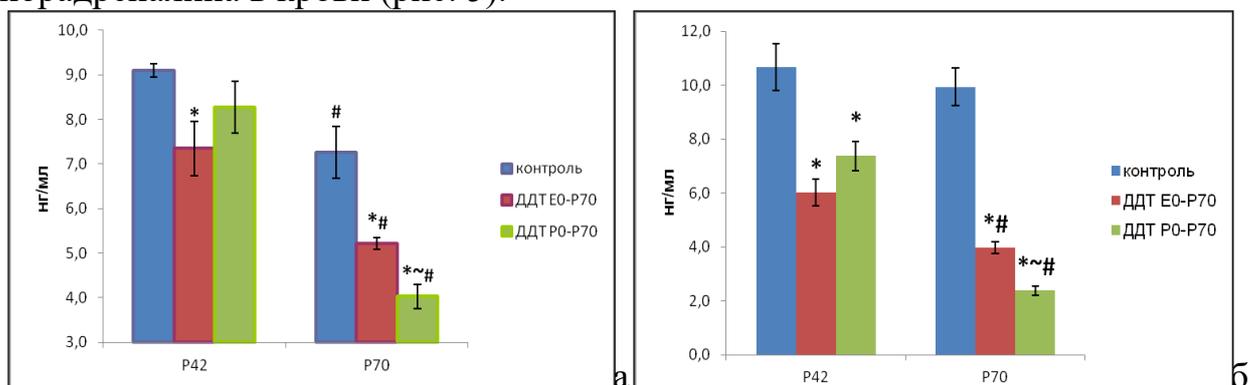


Рис. 5. Возрастные изменения концентрации адреналина (а) и норадреналина (б) в плазме у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с 42-ых по 70-ые сутки постнатального развития.

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

Содержание норадреналина в кровотоке отражает активность периферической симпатической нервной системы, а содержание адреналина указывает на активность мозгового вещества надпочечников. Следовательно, снижение синтеза адреналина обусловлено не уменьшением метилирования норадреналина, а связано со снижением продукции его более ранних предшественников, и что этот процесс происходит как в ХК надпочечников, так и в нейронах периферической нервной системы.

Изменения ультраструктуры хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном и только в постнатальном периодах онтогенеза

В пубертатном периоде у крыс группы пренатального и постнатального воздействия ДДТ выявлены уменьшение содержания митохондрий в адреналоцитах особенно под плазмалеммой, что указывает на уменьшение выделения секреторных гранул с адреналином [Garcia-Sancho J., et al., 2012; Villanueva J., et al., 2014] и уменьшение размеров митохондрий в норадреналоцитах.

Табл. 10.

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±m)

Показатели	Группы	ДДТ		
		Контрольная P42	E0-P42	P0-P42
Адреналоциты				
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*♦
Норадреналоциты				
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 постнатального воздействия 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 (табл. 10).

В постпубертатном периоде у крыс контрольной группы отмечалось усиление функциональной нагрузки митохондрий, что приводило к отеку их матрикса, увеличению размеров и, соответственно, пропорциональному

уменьшению их числа в 1мкм^2 цитоплазмы (табл. 11). Отмечались признаки молекулярного способа выделения содержимого секреторных гранул и локального опустошения цитоплазмы в адреналоцитах.

Табл. 11.

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	ДДТ	
	Контрольная P70	E0-P70	P0-P70
Адреналоциты			
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*◆
Норадреналоциты			
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.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, выявлены схожие ультраструктурные изменения митохондрий адреналоцитов и норадреналоцитов (табл. 15). 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 визуально меньшим, чем в контроле. Отмечалось увеличение формирования первичных лизосом в адреналоцитах. 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. Аналогичные нарушения выделения секреторных гранул, содержащих тироглобулин, были ранее выявлены при изучении воздействия низких доз ДДТ в постнатальном развитии на секреторную деятельность щитовидной железы [Яглова Н.В. с

соавт., 2016]. Это дает основание предположить, что ДДТ нарушает механизмы выделения секреторного материала из ХК.

Сопоставление концентрации катехоламинов в системном кровотоке и ультраструктуры ХК 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 ХК, но не программу осуществления в них секреторных процессов.

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. Коровое вещество надпочечников демонстрирует чувствительность как к пренатальному, так и постнатальному воздействию дисраптора, особенно его КЗ и СЗ. ПЗ в меньшей степени подвержена дисрапторному действию низких доз ДДТ в отличие от действия токсичных доз его метаболитов. Воздействие низких доз ДДТ вызывает существенные изменения стероидогенеза в корковом веществе надпочечников, затрагивающие продукцию как минералокортикоидов, так и глюкокортикоидов и половых стероидов.

В изменении функциональной активности КЗ играет роль снижение темпов ее морфогенеза, обусловленных пренатальным воздействием дисраптора, подавляющим канонический Wnt-сигналинг и активирующим антипролиферативный фактор Nhex. Также снижение синтеза альдостерона является следствием нарушения реорганизации митохондриального аппарата кортикостероцитов и нарушения микроциркуляции на границе КЗ и ПЗ, обусловленных перераспределением венозного оттока от мозгового вещества, направленного на компенсацию недостаточной продукции катехоламинов. В совокупности эти изменения активируют пролиферацию клеток и относительную гиперплазию клубочковой зоны после полового созревания (рис. 6).

Воздействие ДДТ существенно не влияет на морфогенез ПЗ. Деструктивные и репаративные процессы, происходящие в ней в пубертатном периоде, являются следствием нарушений микроциркуляции. Пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ обуславливает более быстрое развитие нарушений трофики клеток в наружной части ПЗ, нежели только постнатальное воздействие, вызывая реактивное усиление секреторной деятельности в более глубоких слоях, а затем компенсаторное

увеличение числа митохондрий в клетках. Этому способствует подавление канонического Wnt-сигналинга (рис. 7).



Рис. 6. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности клубочковой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.



Рис. 7. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности пучковой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

СЗ надпочечников также проявляет чувствительность к действию низких доз ДДТ. Пренатальное воздействие дисраптора приводит к значительному отставанию в развитии СЗ, что в свою очередь, обуславливает пониженную функциональную активность ее кортикостероцитов. Менее выраженная активация транскрипционного фактора Nhex в СЗ позволяет поддерживать пролиферативные процессы на более высоком уровне, что способствует увеличению объема СЗ 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. 8).

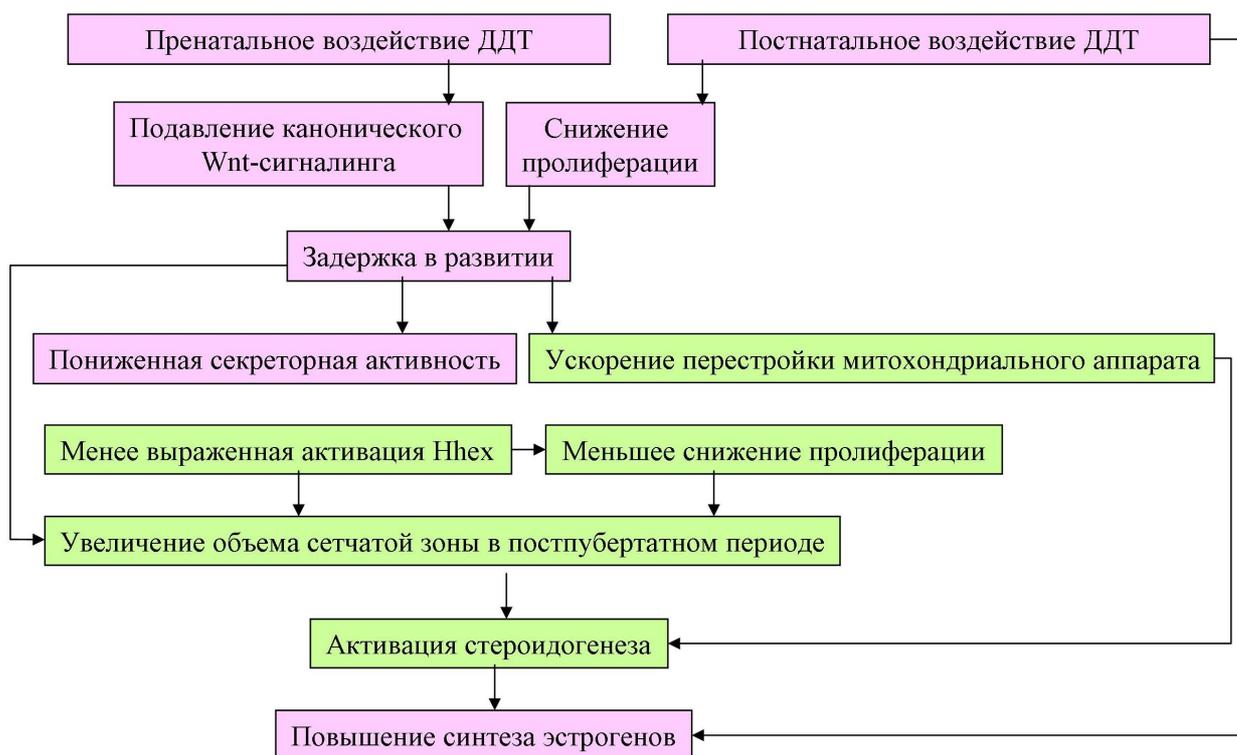


Рис. 8. Изменения морфогенеза и секреторной деятельности сетчатой зоны коркового вещества надпочечников вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

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 ХК, особенности его экспрессии и кооперации с каноническим Wnt-сигналингом, отличающие ХК от кортикостероцитов.

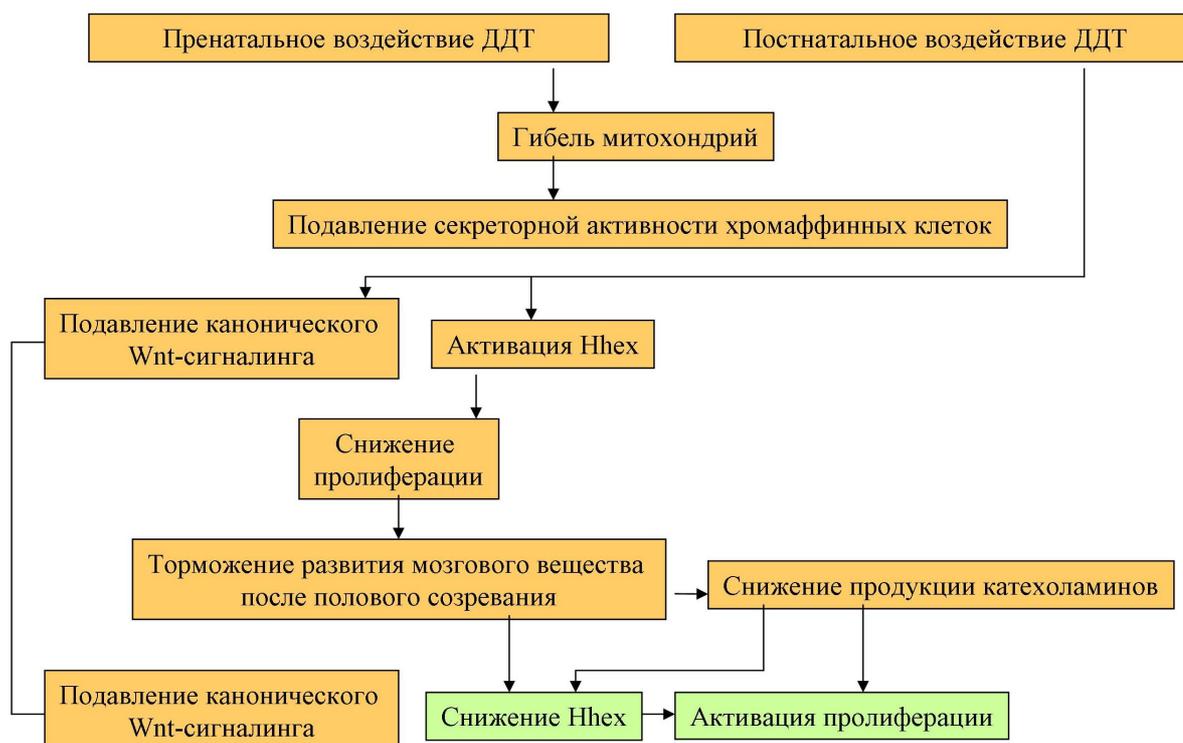


Рис. 9. Изменения морфогенеза мозгового вещества надпочечников и секреторной деятельности хромаффинных клеток вследствие пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах вызывает нарушение секреции катехоламинов, что обусловлено цитофизиологическими изменениями ХК и замедлением темпов развития мозгового вещества. Воздействие ДДТ приводит к нарушению функционирования и гибели митохондрий, а, следовательно, к снижению экзоцитоза секреторных гранул и снижению синтетических процессов в ХК. Изменения на клеточном уровне, направленные на восстановление продукции катехоламинов, заключаются в усилении процессов синтеза в клетках и активации молекулярной секреции. Истощение реактивных изменений приводит к подавлению фазы синтеза и оформления секрета, а также его выделения, что сопровождается выраженным усилением пролиферативной активности ХК. Недостаточное поступление катехоламинов в системный кровоток, вызывает перераспределение венозного оттока и выраженные нарушения микроциркуляции в наружной части коркового вещества, запускающие каскад цито- и гистофизиологических изменений в КЗ и ПЗ (рис. 9).

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.

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/Hex 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/Hex пролиферативных процессов во всех зонах коркового вещества надпочечников.
7. Установлена экспрессия транскрипционного фактора PRH/Hex хромаффинными клетками мозгового вещества. В отличие от кортикостероцитов в хромаффинных клетках наблюдается связь между уровнем экспрессии PRH/Hex и активацией канонического Wnt-сигналинга.

Воздействие эндокринного дисраптора, начавшееся в пренатальном развитии, является фактором, нарушающим кооперацию в экспрессии PRH/Нhex и активации канонического Wnt-сигналинга.

8. Дисрапторное действие низких доз ДДТ на стероидогенез имеет неизбирательный 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 вещества и нарушением структуры митохондрий хромоаффинных клеток. Это приводит к снижению выделения ими секреторных продуктов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК РФ

1. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Изменения гистоархитектоники коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с первого дня постнатального периода // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. Т.6. №3. С.147-150.
2. Yaglova N. V., Tsomartova D. A., Yaglov V. V. Effect of Prenatal and Postnatal Exposure to Low Doses of DDT on Catecholamine Secretion in Rats in Different Period of Ontogeny // Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2017. Vol. 163. No. 4, P.422-424.
3. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии. // Биомедицинская химия. 2017. Т.63, вып.4. С.306-311.
4. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. Морфофункциональные изменения коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, потреблявших низкие дозы эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана с первого дня постнатального онтогенеза // Вопросы питания. 2017. Т.86. №4. С.70-76.
5. Tsomartova D. A., Yaglova N. V., Yaglov V. V. Changes in canonical β -catenin/Wnt signaling activation in the adrenal cortex of rats exposed to endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) during prenatal and postnatal ontogeny // Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2018. Vol. 164. No. 4, P.493-496
6. Yaglova N. V., Tsomartova D. A., Yaglov V. V. Differences in Production of Adrenal Steroid Hormones in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of the Endocrine Disruptor DDT during Prenatal and Postnatal Development // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2018, Vol. 12, No. 1, P. 80–86.
7. Yaglova N. V., Obernikhin S.S., Tsomartova D. A., Nazimova S.V., Yaglov V. V. Expression of Transcription Factor PRH/Hhex in Adrenal Chromaffin Cells in the Postnatal Development and Its Role in the Regulation of Proliferative Processes // Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2018. Vol. 165. No. 4, P. 508-511.
8. Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Yaglov V.V. Secretion of adrenal zona glomerulosa cells in rats exposed to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane during prenatal and postnatal development // Russian Open Medical Journal. 2018. Volume 7. Issue 3. Article CID e0302.
9. Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Следнева Ю. П., Яглов В.В. Изменения кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс при воздействии низких доз ДДТ в постнатальном развитии // Клиническая и экспериментальная морфология. Москва. 2018. №2. С. 25-30.
10. Yaglova N. V., Tsomartova D. A., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Yaglov V. V. Changes in Secretory Activity of Adrenal Zona Fasciculata Cells in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of DDT in Different Periods of Ontogeny // Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2018. Vol. 166. No. 2, P. 283-286.
11. Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Яглов В.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Следнева Ю.П. Морфологические изменения сетчатой зоны коркового вещества надпочечников и секреторной деятельности ее кортикостероцитов в пубертатном периоде у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана // Морфологические ведомости. 2018. №2 (26). С.22-25.
12. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В., Обернихин С.С., Назимова С. В. Изменения секреторной деятельности адреноцитов крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана// Клиническая и экспериментальная морфология. Москва. 2018. № 3. С. 30-34.

13. Yaglova N. V., **Tsomartova D. A.**, Obernikhin S.S., Nazimova S.V. The Role of the Canonical Wnt-Signaling Pathway in Morphogenesis and Regeneration of the Adrenal Cortex in Rats Exposed to the Endocrine Disruptor Dichlorodiphenyltrichloroethane during Prenatal and Postnatal Development // *Biology Bulletin*. 2019. Vol. 46. No. 1. P.74-81.
14. Yaglova N. V., **Tsomartova D. A.**, Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Yaglov V. V. Regulation of Proliferative Processes in Rat Adrenal Cortex by Transcriptional Factor PRH under Conditions of Developmental Exposure to Endocrine Disruptor DDT // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019. Vol. 167. No. 3, P. 404-407.
15. **Цомартова Д.А.**, Яглова Н.В., Назимова С.В., Обернихин С.С., Яглов В.В. Роль канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в постнатальном развитии мозгового вещества надпочечников и его нарушениях, обусловленных воздействием эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана // *Гены и клетки*. 2019. Т. XIV. №2. С. 52-57.

Другие публикации

16. Яглова Н.В., **Цомартова Д.А.**, Яглов В.В. Структурные и функциональные изменения мозгового вещества надпочечников крыс в пубертатном периоде, подвергшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном этапах развития // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016. №8(50). Часть 2. С.34-36.
17. **Цомартова Д.А.** Изменения секреторной деятельности клеток коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном периоде при длительном воздействии низких доз ДДТ. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (11 февраля 2017г.) «Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом» С.33-34.
18. **Цомартова Д.А.**, Яглова Н.В. Морфологические изменения коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста при длительном воздействии эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном развитии // *Материалы V Съезда Российского общества патологоанатомов*. – М.: Группа МДВ, 2017. С.350-351.
19. **Цомартова Д.А.**, Яглова Н.В. Влияние эндокринного дисраптора ДДТ на морфофункциональное состояние надпочечников // *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции IT +M&Ec`2017 (Гурзуф, с 02 по 12 июня 2017 г.)*. 2017. Весенняя сессия. С. 259-262.
20. **Цомартова Д.А.**, Яглова Н.В. Функционирование надпочечников крыс в условиях воздействия низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном онтогенезе // *Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова*. – Воронеж: Издательство «ИСТОКИ», 2017. С. 1396-1398.
21. **Цомартова Д.А.**, Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Изменения продукции катехоламинов у половозрелых крыс, обусловленные дисрапторным действием дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном развитии // *XIV Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии»*. г. Судак, Крым. 30 мая-10 июня 2018г. С. 505-506.
22. Обернихин С.С., Яглова Н.В., **Цомартова Д.А.** Изменения продукции альдостерона при воздействии дихлордифенилтрихлорэтана // *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: труды межд. конф. IT + M&Ec`2018 (Гурзуф, 01-11.06.2018г.)* / под. ред. проф. Е.Л. Глориозова. М.: ИНИТ, 2018. Весенняя сессия. С. 261-266.
23. **Цомартова Д.А.** Дисрапторное действие ДДТ на функционирование сетчатой зоны надпочечников // *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: труды межд. конф. IT + M&Ec`2018 (Гурзуф, 01.06-11.06.2018 г)* / под. ред. проф. Е.Л. Глориозова. М.: ИНИТ, 2018. Весенняя сессия. С.274-277.
24. **Цомартова Д.А.**, Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Следнева Ю.П., Яглов В.В. Морфологическая характеристика коркового вещества надпочечников половозрелых

крыс, развивавшихся в условиях ежедневного воздействия дихлордифенилтрихлорэтана // Материалы XIV Конгресса Международной ассоциации морфологов. Морфология. 2018. Т. 153. №3. С.301.

25. **Цомартова Д.А.** Ультраструктурные изменения хромаффинных клеток надпочечников половозрелых крыс, развивавшихся в условиях пренатального и постнатального воздействия низких доз ДДТ // Сборник трудов Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» Москва. 1-2 ноября 2018г. С.74-75.

26. **Цомартова Д.А., Назимова С.В., Яглов В.В.** Возрастные изменения экспрессии фактора Nhex и пролиферации клеток в корковом веществе надпочечников // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: труды межд. конф. IT + M&Ec`2019 (Гурзуф, 01.06-11.06.2019 г) / под. ред. проф. Е.Л. Глориозова. М.: ИНИТ, 2019. Весенняя сессия. С. 101-103.

27. **Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Яглов В.В.** Транскрипционный контроль процессов пролиферации в корковом веществе надпочечников // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Д.Х. Нарзиева «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных (г. Витебск, Беларусь, 31 октября -1ноября 2019г.). С. 85-87.

Список сокращений

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

КЗ – клубочковая зона

МЦР – микроциркуляторное русло

ПЗ – пучковая зона

СЗ – сетчатая зона

ХК – хромаффинные клетки

ЭПС – эндоплазматическая сеть