

УДК: 615.361.451.014.41

Сравнительная морфологическая структура надпочечников и их органотипических культур у животных различных возрастных групп **Юссеф Хани Румиех**

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

В работе изучена структура надпочечников и их органотипических культур, а также произведена оценка функциональной активности надпочечников у крыс разного возраста (1, 3, 6, 12 и 24 мес.). Показано, что у животных в возрасте 1 и 3 мес. сохранены и развиты структурные компоненты всех зон коры, у 6-месячных животных выявляется наибольшая степень пролиферации всех трех зон коры и наибольшая функциональная активность пучковой зоны. Начиная с 6-месячного возраста, у крыс проявляются изменения в структуре ткани надпочечников, регистрируется появление одиночных клеток с признаками апоптоза. У взрослых (12 мес.) и старых животных (24 мес.) обнаруживаются группы клеток с признаками апоптоза. Изменения гистоструктуры тканей целой железы совпадают с изменениями, наблюдаемыми в органотипических культурах, однако эти изменения в последних более выражены.

Ключевые слова: *надпочечники, органотипические культуры надпочечников, гистологическая структура, онтогенез.*

Порівняльна морфологічна структура наднирників та їх органотипових культур у тварин різних вікових груп **Юсеф Хані Румієх**

У роботі вивчено структуру наднирників та їх органотипових культур, а також проведено оцінку функціональної активності наднирників у щурів різного віку (1, 3, 6, 12 і 24 міс.). Показано, що у тварин у віці 1 та 3 міс. збережені та розвинуті структурні компоненти усіх зон кори, у 6-місячних тварин виявляється найбільший ступінь проліферації усіх трьох зон кори і найбільша функціональна активність пучкової зони. Починаючи з 6-місячного віку, у щурів виявляються зміни у структурі тканини наднирників, реєструється поява окремих клітин з ознаками апоптозу. У дорослих (12 міс.) та старих (24 міс.) тварин спостерігаються групи клітин з ознаками апоптозу. Зміни гістоструктури тканин цілої залози співпадають із змінами, що виявляються в органотипових культурах, але в останніх зміни більш виражені.

Ключові слова: *наднирники, органотипові культури наднирників, гістологічна структура, онтогенез.*

Comparative morphological structure of adrenal glands and their organo-typical cultures of animals of different age **Youssef Hani Roumieh**

Structure of adrenal glands and their organo-typical cultures of the rats of different ages (1, 3, 6, 12, 24 months) has been studied; functional activity of adrenal glands has been estimated. It has been shown that structural components of all zones of cortex are developed in 1- and 3-month-old rats, 6-month-old animals have maximal level of proliferation of all three zones of cortex and maximal functional activity of fascicular zone. Beginning from 6 months in rats the changes in structure of adrenal glands, appearance of separate cells with apoptosis features have been revealed. In adult (12 months) and old (24 months) rats the groups of cells with apoptosis features have been observed. Changes of histological structure of a whole gland have coincided with changes in organo-typical cultures, but these changes were more expressed in the last ones.

Key words: *adrenal glands, organo-typical cultures of adrenal glands, histological structure, ontogenesis.*

Введение

В последнее время значительное внимание многих ученых направлено на изучение вопросов эндокринной регуляции процессов старения. Известно, что надпочечники являются единственным органом в организме млекопитающих, ответственным за адаптационные возможности организма (Мельниченко, Фадеев, 1997), а утрата кортикостероидной функции надпочечников может сопровождаться летальным исходом (Марри и др., 1993). По мере старения организма происходит изменение гормональной активности тканей надпочечников – уровень стероидных гормонов в крови

млекопитающих снижается (Канунго, 1982; Юсеф Хани Румиех, Бондаренко, 2007). Старение сопровождается накоплением генетических сдвигов, развитием различных болезней обмена и патологии эндокринных органов, что иногда диктует необходимость заместительной гормональной терапии.

Любые изменения, приводящие к нарушению процессов синтеза и секреции гормонов, могут стать серьезной причиной нарушения обмена веществ не только углеводов и белков, но и обмена веществ в целом. Именно поэтому пристальное внимание биологов и медиков сосредоточено на выяснении механизмов, приводящих к нарушению функционирования тканей надпочечников при старении организма.

На уровне целого организма весьма сложно изучить природу механизмов, приводящих к нарушениям функционирования надпочечников. Развитие техники культивирования клеточных и органных культур эндокринных тканей, а также многочисленные работы, доказывающие сохранение органотипическими культурами специфических функций желез (Бондаренко, Геращенко, 2001; Турчин та ін., 2007), позволяют использовать культуры в качестве объекта исследований для выяснения механизмов, реализующихся при старении. Для этих целей можно использовать культуры, получаемые из тканей надпочечников животных разного возраста.

Целью работы явился сравнительный анализ морфо-функциональных характеристик надпочечников и их органотипических культур в онтогенезе белых крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на 40 белых беспородных крысах разного возраста (1, 3, 6, 12 и 24 месяца), содержащихся в стандартных условиях вивария. Манипуляции с животными производили согласно положениям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной или другой целью» (г. Страсбург, 1985). Извлечение эндокринных желез осуществляли с соблюдением строгих правил асептики и антисептики после легкого наркоза эфиром и декапитации животных. Культивирование проводили в течение 5 суток по стандартной методике (Тронько и др., 1990).

У животных всех возрастных групп после наркоза выделяли надпочечники, фиксировали в 40% формалине. При поперечном разрезе вырезали кусочки, которые подвергались парафиновой проводке (Лилли, 1969), с последующим изготовлением срезов (5–7 мкм). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Часть препаратов подвергалась окраске суданом III для выявления липидов, что позволяло судить об их функциональной активности (Гаврилюк, Сафронов, 1983). Аналогичные исследования были проведены и на 40 органотипических культурах, полученных из надпочечников животных разных возрастных групп.

Окрашенные микропрепараты изучали в световом микроскопе фирмы Carl Zeiss Ena.

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании надпочечников 1-месячных животных выявлены сформированная структура органа, наличие тонкой фиброзной капсулы с небольшим количеством зрелых фибробластов, четкая стратификация коры надпочечника, состоящей из трех слоев с хорошо различимой структурой. Клубочковая зона была представлена узкой полосой шириной 0,7 см, клетки имели небольшие размеры, ядра хорошо воспринимали краску, имели сравнительно одинаковые размеры, окрашивались однородно в вишнево-сиреневые тона, гетерохромия не выявилась. Наиболее четко была представлена пучковая зона, которая была достаточно широкой, 0,65 см. Пучковая направленность тяжей перпендикулярно капсуле органа была четко обозначена. Тяжи, а также клетки и их ядра были сравнительно одинаковой величины. Более поверхностные тяжи пучковой зоны, граничащие с клубочковой зоной, были более широкие, чем пучковые тяжи, граничащие с сетчатой зоной. Сетчатая зона состояла из хорошо развитых, анастомозирующих тяжей, разделенных узкими синусоидными капиллярами. Для клеток сетчатой зоны характерны мономорфность и однородная окраска, ядра клеток хорошо окрашивались, имели одинаковые размеры и четкие контуры (рис. 1). Функциональные свойства коры надпочечников у 1-месячных крыс выражены слабо, о чем свидетельствует наличие немногочисленных липидных капель в клетках.

Органотипическая культура надпочечников от 1-месячных животных (рис. 2) вполне адекватна структуре органа у животных данного возраста. Ширина клубочковой зоны умеренная, клетки достаточно однотипны, имеют хорошо развитые мономорфные ядра, количество ДНК достаточно.

Клетки пучковой зоны нормальных размеров, крупные, в цитоплазме наблюдается небольшое количество липидов.

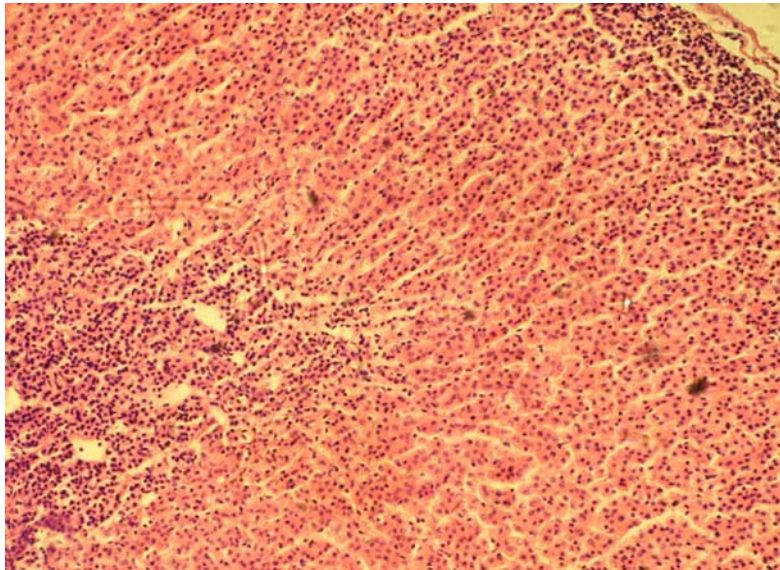


Рис. 1. Надпочечник одномесячного животного. Структура надпочечника сформирована полностью. Четко очерчена капсула, довольно хорошо развита пучковая и сетчатая зона. Липиды в клетках выявлены в небольшом количестве

Примечание: окраска гематоксилин-эозин (×56).

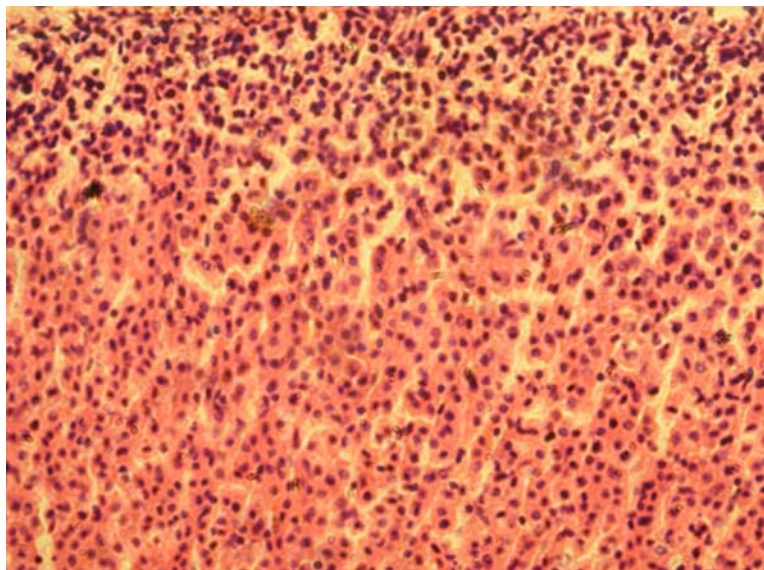


Рис. 2. Органотипическая структура надпочечника 1-месячного животного. Нормальная, хорошо сформированная структура надпочечника. Четко обозначены клубочковая и пучковая зоны. В клетках четко обозначены ядра. Количество дистрофически измененных клеток очень невелико, в основном в околоклубеньковых отделах пучковой зоны. В клетках находится небольшое количество липидов

Примечание: окраска гематоксилин-эозин (×280).

Морфологическое исследование надпочечников у 3-месячных животных показало, что их структура мало отличается от структуры органа у 1-месячных животных. Отмечена только несколько

большая пролиферация клеток коркового вещества. В клубочковой зоне выявляется гиперхромия клеточных ядер, немногочисленные митотически делящиеся клетки. По форме, величине и окрашиванию клетки клубочковой и пучковой зоны достаточно мономорфны. Синусоидные капилляры пучковой зоны умеренно узкие, пучковая направленность хорошо выражена, пучки клеток и тяжи располагаются перпендикулярно капсуле органа.

Функция у надпочечников крыс трехмесячного возраста слабо выражена, о чем свидетельствует слабо выраженная липидная инфильтрация клеток коры надпочечников при окраске на липиды, хотя есть некоторая зональность, где липидсинтетическая функция усилена.

Морфологическое исследование органотипической структуры надпочечника от 3-месячных животных показало, что она достаточно адекватна структуре органа животных этого возраста. Пучковая направленность тяжей клеток четко обозначена и является перпендикулярной капсуле органа. Клетки пучковой зоны содержат несколько большее количество липидов, чем надпочечник, однако в культуре выявлены слабовыраженная гетерохромия и наличие отдельных клеток, в которых цитоплазма слабо визуализируется.

Микроскопическое исследование структуры и функции надпочечника 6-месячных крыс выявило значительно большую ширину клубочковой зоны, выраженную пролиферацию и плотность клеток, чем в другие сроки.

Вместе с тем имела место слабо выраженная дискompенсация клеточных структур, гетерохромия и анизотитоз клеток. Наряду с хорошо структурированными клетками с четкими границами и ярко окрашенными ядрами обнаружены одиночные клетки в состоянии апоптоза и клетки с нечеткими размытыми границами, а также безъядерные клетки в результате кариолиза. Пучковая зона была хорошо развита с выраженной секрецией липидов. Однако в нижних отделах пучковой зоны отмечается нарушение ритмичности пучкового строения, гетерохромия и полиморфизм клеток, что свидетельствует о дистрофических изменениях клеток этой зоны.

Морфология органотипической структуры надпочечника у 6-месячных животных адекватна структуре органов у животных этого возраста. В клубочковой зоне выявлены плотные структуры клеток, хорошо воспринимающих окраску, с небольшим количеством клеток, слабо воспринимающих краски, с наличием кариолиза и слабо обозначенных границ клеток.

Пучковая зона хорошо развита, четко обозначена, но у отдельных животных наблюдается слабый полиморфизм величины и формы клеток, уменьшение клеток в размерах, пикнотичные ядра. По сравнению с функцией надпочечников у крыс этого возраста функция клеток пучковой зоны менее выражена.

Микроскопическое исследование надпочечников у животных в возрасте 1 года выявило значительное утолщение капсулы органа, превосходящее толщину последней у крыс в возрасте 1 месяца в 5–6 раз. Причем идет активная фибротизация капсулы, о чем свидетельствует значительная ее клеточность за счет молодых крупных фибробластов.

Морфологическое изучение сетчатой зоны органотипической культуры надпочечников крыс в возрасте 1 года (рис. 3) выявило очаговое повреждение органов. Мелкие мультицентрические очаги повреждения характеризовались разрушением структуры органа и появлением на их месте круглоклеточных инфильтратов, состоящих из иммунокомпетентных клеток, в основном представленных лимфоцитами с небольшой примесью плазматических клеток, гистиоцитов и единичных макрофагов. Вполне вероятно, что такая морфологическая картина могла быть не обязательно связана с возрастными изменениями, поскольку они реализуются за счет апоптоза, для которого не характерно развитие воспалительных процессов.

Скорее всего, в данном случае могло возникнуть при условиях культивирования либо бактериальное загрязнение, либо животные, которые были взяты в эксперимент, имели какие-либо хронические патологические процессы, которые в условиях культивирования (отсутствии нейрогуморальной регуляции в условиях *in vitro*) проявились в полной мере. Таким образом, наблюдаемые иммунологически обусловленные процессы могут быть генерированы либо хроническим воспалительным процессом, либо аутоиммунной агрессией.

Полученные нами данные очень важны с точки зрения тщательного подбора донора для органотипических культур для исключения развития патологического процесса во время культурального периода и возможного осложнения в виде отторжения трансплантата или передачи патологического процесса донору и отсутствия ожидаемого терапевтического эффекта при пересадке и имплантации органотипических структур.

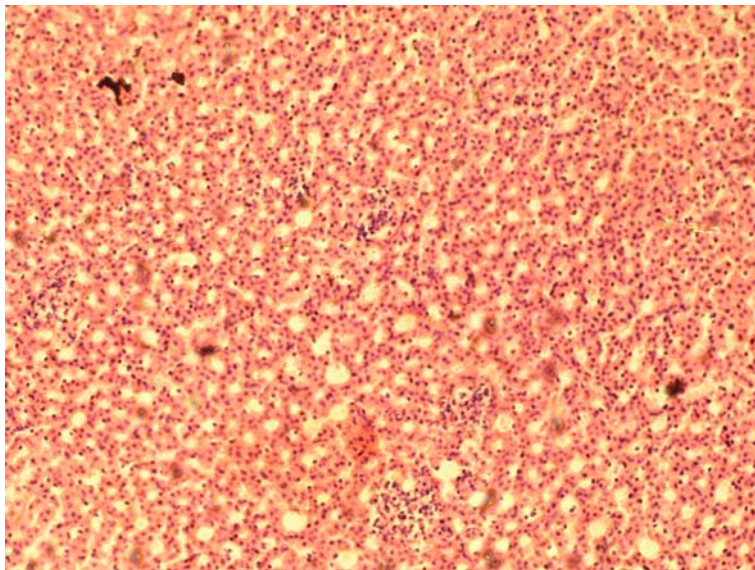


Рис. 3. Органотипическая культура животных в возрасте 1 года. Хорошо выраженная сетчатая зона с наличием множества мелких лимфоидноклеточных гранул
Примечание: окраска гематоксилин-эозин ($\times 56$).

Морфологическое изучение структуры и функции надпочечников у 24-месячных животных выявило разнообразную по структуре и функции картину в трех вариантах. С одной стороны, как в надпочечниках, так и в органотипических культурах (рис. 4) обнаружена однотипная структура с четким разделением коры надпочечников на 3 зоны. Наиболее развитой оказалась пучковая зона. Однако функциональные свойства клеток этой зоны несколько снижены по сравнению с 6-месячными и годовалыми животными, отмечаются мелкие и более крупные очаги лизиса групп клеток и парабиоза.

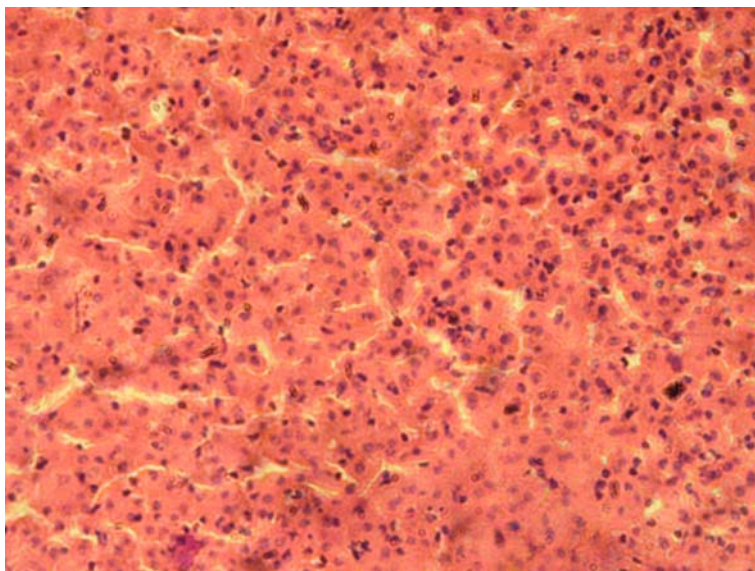


Рис. 4. Органотипическая культура 2-летнего животного. Гиперплазия клубочковой зоны, ядра клеток которой преимущественно пикнотичны. Пучковая зона содержит довольно объемные поля клеток в состоянии парабиоза с отсутствием ядер, клеточных границ и лизирующихся клеток. Функция пучковой зоны слабо выражена и липидные капли немногочисленны, мелкие, едва заметные
Примечание: окраска гематоксилин-эозин ($\times 280$).

Другой разновидностью изменений были атрофия всех зон коркового вещества, апоптоз большинства клеток и образование пустот на их месте. Клетки, оставшиеся неразрушенными, оказались сморщенными, границы клеток и ядер нечеткие, а многие клетки значительно уменьшены в размерах.

Ширина клубочковой зоны несколько уменьшилась по сравнению с отмеченной у животных годовалого возраста, но все же остается в 2–2,5 раза шире, чем у животных первой группы, т.е. в возрасте 1 месяца. В структуре клубочковой зоны выявляется дискompенсация клеточных структур в виде чередования усиленной плотности и разрежения, гиперхромии ядер за счет большой адсорбции краски клетками в состоянии дистрофии и пикноза ядер. Особенно выражена дезорганизация структуры пучковой зоны, где пучковость выявляется на меньшей площади среза, а чаще клетки расположены в виде однородных клеточных структур. Обнаружена выраженная функциональная активность органов, клетки которых имеют крупные размеры, цитоплазма в них светлая, богатая липидами. Однако имеет место дистрофия и сморщивание клеток, пикноз ядер, что создает полиморфную и гетерохромную структурную организацию надпочечника с органами безъядерных клеток за счет кариолиза, с нечеткими границами клеток в состоянии парабиоза.

Для изменений третьей группы также характерны атрофия коры надпочечников, очаги некрозов, лизиса клеток, дезорганизации пучковых структур, явления парабиоза и апоптоза, кариолиза и цитолиза. Вместе с тем, в отличие от изменений второго типа, в таких надпочечниках, а главное в их органотипических структурах, выявляли наличие доброкачественных опухолей – аденом надпочечников.

Последнее обстоятельство чрезвычайно важно в плане тщательного отбора образцов надпочечников для получения их органотипических структур, поскольку полученные нами морфологические данные свидетельствуют о переходе в органотипические культуры патологии воспалительной и аутоиммунной природы и даже возможного продолжения опухолевого процесса.

Выводы

1. У молодых животных в возрасте 1 и 3 месяцев структура надпочечников и их органотипических культур морфологически идентична и свидетельствуют о нормальном соотношении и хорошей стратификации зон коры надпочечников.
2. Структура надпочечников и их органотипических культур взрослых животных в возрасте 6 месяцев свидетельствует о наивысшем развитии клубочковой пучковой и сетчатой зон и о высокой функциональной активности надпочечников как в ткани самого органа, так и в его органотипической культуре.
3. У животных 12-месячного возраста наблюдается утолщение капсулы органа, появляются нерезко выраженные признаки дискompенсации клеточных структур, гетерохромия, полиморфизм, деструкция и пикноз ядер, с сохранением функциональной активности клеток пучковой зоны. Морфологические изменения носят очаговый характер. Однотипные изменения выявлены как в органе, так и в его органотипической структуре. В органотипической культуре в отдельных случаях выявляются признаки хронического продуктивного иммунного воспаления.
4. Морфологические изменения в надпочечниках и их органотипической культуре у старых 2-летних животных имеют три разновидности: первая – относительно слабо выраженные признаки альтерации клеток со сниженными функциональными свойствами; вторая – выраженная альтерация органов; третья – атрофия коры надпочечников с развитием доброкачественной опухоли – аденомы надпочечников в органотипических структурах, что, несомненно, обусловлено как действием тропных гормонов гипоталамуса и гипофиза, так и контролем со стороны других регуляторных систем организма (нервной, эндокринной и иммунной).

Список литературы

- Бондаренко Т.П., Герашченко А.В. Функциональные характеристики органной культуры надпочечников новорожденных поросят после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 108–109. /Bondarenko T.P., Gerashchenko A.V. Funktsional'nyye kharakteristiki organnoj kul'tury nadpochechnikov novorozhdennykh porosyat posle kriokonservirovaniya // Problemy kriobiologii. – 2001. – №2. – S. 108–109./
- Гаврилюк Б.К., Сафронов В.П. Органотипическое культивирование тканей. – М.: Наука, 1983. – 82с. /Gavriilyuk B.K., Safronov V.P. Organotipicheskoye kultivirovaniye tkaney. – M.: Nauka, 1983. – 82s./
- Канунго М. Биохимия старения. – М.: Мир, 1982. – 294с. /Kanungo M. Biokhimiya stareniya. – M.: Mir, 1982. – 294s./
- Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645с. /Lilli R.

Patogistologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya. – М.: Mir, 1969. – 645s./

Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. – М.: Мир, 1993. – Т. 2. – 413с. /Marri R., Grenner D., Meyes P., Roduell V. Biokhimiya cheloveka. – М.: Mir, 1993. – Т. 2. – 413s./

Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Основы лабораторной диагностики надпочечниковой недостаточности // Клиническая лаб. диагностика. – 1997. – №8. – С. 26–32. /Mel'nichenko G.A., Fadeyev V.V. Osnovy laboratornoy diagnostiki nadpochechnikovoy nedostatochnosti // Klinicheskaya lab. diagnostika. – 1997. – №8. – S. 26–32./

Тронько Н.Д., Рыбаков С.И., Комиссаренко И.В. и др. Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культур клеток коры надпочечных желез. Метод. рекомендации. – К.: Изд-во Минздрав Украины, 1990. – 24с. /Tron'ko N.D., Rybakov S.I., Komissarenko I.V. i dr. Lecheniye khronicheskogo gipokortitsizma metodom transplantatsii kul'tur kletok kory nadpochechnykh zhelez. Metod. rekomendatsii. – K.: Izd-vo Minzdrav Ukrainy, 1990. – 24s./

Турчин І.С., Ларін О.С., Дроздович І.І., Сидоренко Л.М. Застосування комбінованих органних культур ендокринних залоз для лікування ендокринопатій: досягнення та перспективи // Трансплантологія. – 2007. – Т.9, №1. – С. 293–296. /Turchin I.S., Larin O.S., Drozdovych I.I., Sydorenko L.M. Zastosuvannya kombinovanykh organnykh kul'tur endokrynnykh zaloz dlya likuvannya endokrynopatyi: dosyagnennya ta perspektyvy // Transplantologiya. – 2007. – Т.9, №1. – S. 293–296./

Юсеф Хани Румиех, Бондаренко Т.П. Возрастные изменения морфо-функциональных характеристик надпочечников и их органотипических культур // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія біологія. – 2007. – №788. – С. 165–170. /Yussef Khani Rumiyeckh, Bondarenko T.P. Vozrastnyye izmeneniya morfo-funktsional'nykh kharakteristik nadpochechnikov i ikh organotipicheskikh kul'tur // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya biologiya. – 2007. – №788. – S. 165–170./

Представлено: Г.А.Божок / Presented by: G.A.Bozhok

Рецензент: В.А.Бондаренко / Reviewer: V.A.Bondarenko

Подано до редакції / Received: 20.01.2012