

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН ...

УДК: 615.361.451.014.41

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Юссеф Хани Румиех

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

В работе исследована базальная и стимулируемая секреция гормонов органотипическими культурами из надпочечников белых крыс разного возраста (1-, 3-, 6- и 12-месячные), уровень потребления культурами экзогенного холестерина и жизнеспособность клеток в культуре. Установлено, что секреторная способность клеток культуры и потребление ими экзогенного холестерина зависит от возраста животного, из тканей которого получены культуры. Максимальной активностью обладают культуры, полученные из тканей животных 3-6 месяцев. Культуры, полученные из тканей старых животных (12 месяцев), имеют меньшую активность.

Ключевые слова: *органотипические культуры надпочечников, секреция гормонов, утилизация холестерина, жизнеспособность, возраст животного.*

Введение

Широкий интерес медиков и биологов к физиологии коры надпочечников связан с тем, что данный орган играет важную роль в адаптации организма. Ключевая роль в этом плане принадлежит глюкокортикоидам, из которых высокой биологической активностью обладают дегидрокортикостерон, кортикостерон, альдостерон, кортизон и кортизол. Из глюкокортикоидов, поступающих в кровь, глюкокортикоидным эффектом обладают кортикостерон и кортизол, что связано с наличием гидроксигруппы в 11 положении в циклопентанпергидрофенантроновом ядре. Видовой особенностью крыс является доминирующее присутствие кортикостерона (Mitani, 1994). Синтез глюкокортикоидов осуществляется из экзогенного холестерина (Rainey, 1992). Секреция и синтез глюкокортикоидов регулируется аденокортикотропным гормоном (АКТГ). Утрата глюкокортикоидной функции надпочечников ведет к летальному исходу, а с возрастом происходит изменение гормональной активности тканей надпочечников (Марри, 1993). В связи с этим целью данной работы явилось исследование функциональной активности культур тканей надпочечников, полученных из эндокринных желез животных разного возраста.

Методики

Все исследования были проведены на белых беспородных крысах разного возраста (1-, 3-, 6- и 12-месячных), содержащихся в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с животными производили согласно положениям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной или другой целью» (г.Страсбург, 1985). Экстирпацию эндокринных желез осуществляли с соблюдением строгих правил асептики и антисептики у животных после легкого наркоза эфиром и декапитации. Культивирование осуществляли по стандартной методике (Тронько, 1990) в течение 5-ти суток. Экстракты из гипофиза получали, как описано в работе (Легач, 1998) и нормировали на белок, определяемый по методу Бредфорда (1985). Жизнеспособность клеток в культуре определяли колориметрическим методом Мигел в модификации (Бондаренко, 2001). Глюкокортикоиды определяли флуориметрическим методом А.Г.Резникова в модификации (Бондаренко, 2001). Холестерин определяли спектрофотометрическим дигитониновым методом (Кейтс, 1975). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по методу Стьюдента-Фишера (Зайцев, 1984) с помощью пакета программ Excel и SigmaPlot.

Результаты и обсуждение

В настоящее время является доказанным, что эндокринные клетки в случае сохранения своей структурной целостности и растущие вне организма могут не только секретировать соответствующие гормоны при наличии экзогенных предшественников, но и потреблять эти предшественники для синтеза гормонов (Уено, 2001). Исходя из этого, на первом этапе нашей работы мы провели исследования по определению жизнеспособности клеток культуры во все сроки культивирования (1-5

сутки). Одним из показателей структурной целостности клеточных мембран является способность клеток исключать трипановый синий – суправитальный краситель, который был использован для оценки количества жизнеспособных клеток, получаемых в ходе ферментативного расщепления фрагментов органотипических культур надпочечников. В наших исследованиях за 100% было принято количество клеток ткани, используемой для культивирования. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.
Жизнеспособность клеток органотипических культур, полученных из надпочечников крыс разного возраста в различные сроки культивирования в % от исходно взятого материала

Культура	Сроки культивирования				
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток
Из ткани 1- мес. крыс	78, 21 ± 4,49	80, 32 ± 5,35	82, 28 ± 5,15	82, 88 ± 5,61	84, 48 ± 5,69
Из ткани 3- мес. крыс	79, 08 ± 4,61	80, 88 ± 5,01	81, 80 ± 5,21	81, 78 ± 5,74	85, 82 ± 6,51
Из ткани 6-мес. крыс	79, 28 ± 5,01	81, 76 ± 5,63	82, 48 ± 5,64	83, 76 ± 5,69	84, 33 ± 6,24
Из ткани 12- мес. крыс	73, 08 ± 4,66	74, 32 ± 5,02	74, 55 ± 5,01	73, 38 ± 4,91	75, 80 ± 4,67

Из представленных данных можно видеть, что культура после 1-х суток культивирования во всех случаях имела изначальную жизнеспособность порядка 73-78%. Скорее всего, это связано с методикой получения культур, когда ткань подвергается иссечению. Клетки, которые во время этой процедуры были подвержены механическим повреждениям, погибают. Полученные результаты согласуются с данными, полученными для органотипических культур из надпочечников, семенников и щитовидной железы новорожденных поросят (Бондаренко, 2001). В последующие сроки культивирования во всех случаях отмечалась тенденция к росту числа жизнеспособных клеток, что может быть свидетельством того, что клетки в культуре способны расти. Однако это увеличение не было статистически достоверным по отношению к данным, полученным для 1 суток. Исключение составляли 5-ые сутки для культур, полученных из надпочечников 1-6-месячных животных ($P < 0,05$ относительно 1-ых суток). Следует также отметить, что меньшую жизнеспособность по сравнению с культурами из тканей молодых животных имели культуры из тканей старых животных. Причем в последнем случае не отмечалась и тенденция к росту культуры. Это может быть связано с развитием процессов старения в тканях надпочечников. Но об этом можно судить лишь по данным, полученным по исследованию функциональных характеристик органотипических культур. На рис. 1 представлены данные по динамике секреции 11-ОКС в среду культивирования.

Можно видеть, что профили кривых по динамике секреции 11-ОКС для культур, полученных из тканей животных разного возраста, совпадают. Во всех случаях максимальная секреция наблюдается на 5-ые сутки. Эти данные совпадают с данными других исследователей (Легач, 1998; Самченко, 2002). Для всех возрастных групп в этот срок культивирования мы отмечали достоверные различия ($P < 0,05$) по отношению к уровню секреции в 1-ые сутки культивирования. Различия между данными, полученными для трех возрастных групп (1, 3 и 6 месяцев) не были достоверными, однако у культур, полученных из тканей старых животных, секреторная способность была снижена на 17-20% по сравнению с культурами, полученными от других возрастных групп.

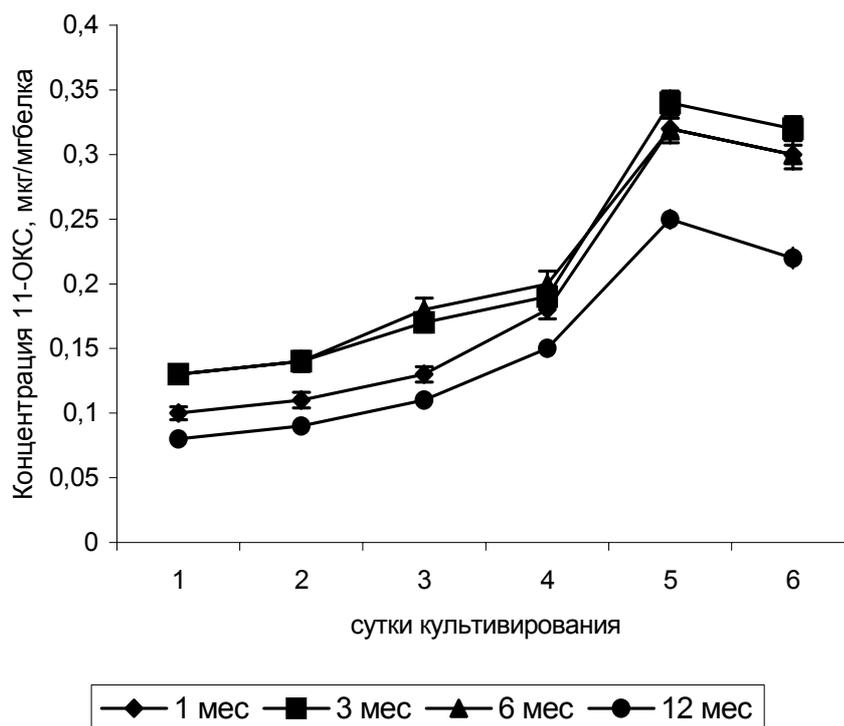


Рис. 1. Динаміка секреції 11-ОКС в середі культивування органотиповими культурами надпочечників крыс різного віку (n=8)

Поскольку на уровне организма синтез и секреция глюкокортикоидов контролируется АКТГ, нам представлялось целесообразным выяснить, как культуры реагируют на данный гормон. Для этих целей мы использовали экстракт гипофиза (ЭГ), содержащий АКТГ. В этих экспериментах мы использовали культуры, имеющие максимальную активность, то есть 5-суточные культуры. После введения ЭГ культуры инкубировали 1 час в культуральной среде и сравнивали с культурами без введения ЭГ. Полученные данные представлены в табл. 2. Из представленных данных видно, что все исследуемые культуры отвечают на введение ЭГ увеличением уровня секреции гормонов. Однако это

Таблица 2.

Уровень базальной и стимулируемой секреции гормонов культурами, полученными из надпочечников животных разного возраста (n=8)

Культуры из надпочечников животных разного возраста	Уровень базальной секреции 11-ОКС в мкг/мг белка	Уровень стимулируемой ЭГ секреции 11-ОКС в мкг/мг белка
1-месячные животные	$0,320 \pm 0,015$	$0,384 \pm 0,019$ $P < 0,05$
3-месячные животные	$0,341 \pm 0,016$	$0,409 \pm 0,023$ $P < 0,05$
6-месячные животные	$0,337 \pm 0,014$	$0,387 \pm 0,020$ $P < 0,05$
12-месячные животные	$0,250 \pm 0,013$	$0,277 \pm 0,015$ $P < 0,05$

увеличение различно в культурах, получаемых из тканей молодых и старых животных. Если для тканей 1-6-месячных животных прирост стимулированной АКТГ секреции составлял порядка 19-20%, то для культур из тканей старых (12 мес.) животных он был в 2 раза меньшим. Это может означать, что с возрастом в тканях надпочечников может изменяться секреция гормонов либо за счет

уменьшения синтетических процессов образования гормонов, либо за счет изменения рецепторных взаимодействий. Известно, что синтез гормонов происходит за счет экзогенного холестерина. В связи с этим следующий этап наших исследований был сосредоточен на выяснении количественных изменений потребления культурами холестерина, находящегося в среде культивирования. За 100% принимался уровень холестерина в питательной среде. Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 3.
Утилизация различных фракций холестерина органотипическими культурами из надпочечников крыс разного возраста за 90 мин инкубации из среды культивирования (n=8)

Культуры из тканей животных разного возраста	Фракции холестерина в % от исходного уровня в среде	
	Суммарный	Свободный
1 месяц	65,3 ± 4,5	44,3 ± 2,9
3 месяца	63,8 ± 3,9	42,8 ± 3,1
6 месяцев	64,7 ± 4,2	43,3 ± 3,2
12 месяцев	53,4 ± 3,7 P < 0,05	35,3 ± 2,7 P < 0,05

Видно, что культуры, полученные из тканей старых животных, утилизируют меньше холестерина, чем культуры из тканей молодых животных, и это различие достоверно относительно значений для культур из тканей молодых животных. Это означает, что при старении изменяется скорость синтетических процессов образования гормонов, что и обуславливает меньшую секрецию гормонов как базальную, так и стимулируемую.

Выводы

Из представленных данных можно сделать вывод о том, что в онтогенезе тканей надпочечников происходят изменения, связанные со снижением синтетической активности образования гормонов, о чем свидетельствуют данные по снижению утилизации клетками экзогенного холестерина. Кроме того, с возрастом происходит снижение уровня секреции гормонов, что связано с нарушением взаимодействия рецепторов со стимуляторами стероидогенеза, что подтверждается данными по изучению стимулируемой секреции в присутствии ЭГ. Это означает, что при старении изменяется не только скорость синтетических процессов, обуславливающих снижение уровня базальной секреции гормонов, но и нарушения поверхности клеточных мембран, обуславливающих изменения рецепторных взаимодействий, приводящих к снижению стимулируемой секреции гормонов.

Список литературы

- Бондаренко Т.П., Геращенко А.В., Божок Г.А., Алабедаькарим Н.М. Оптимизация условий экстрагирования и развития флуоресценции при определении глюкокортикоидов в биологических жидкостях // Лабораторная диагностика. – 2001. – №3. - С. 36-39.
- Бондаренко Т.П., Волкова Н.А. и др. Колориметрическое определение жизнеспособности органной культуры клеток, надпочечников и щитовидной железы // Лабораторная диагностика. – 2001. – №4. - С. 43-48.
- Дарбе А. Практическая биохимия белка. – М.: Мир, 1989. – 623с.
- Зайцев Т.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии. - М.: Наука, 1984. – 424с.
- Кейтс М. Техника липидологии. - М.: Мир, 1975. – 365с.
- Легач Е.И. Влияние криоконсервирования на адренкортикальную ткань. Дисс... канд. мед. наук 03.00.19. – Харьков, 1998. – 128с.
- Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. - М.: Мир, 1993. – Т.2. – 413с.
- Самченко И.И. Влияние криоконсервирования и условий обработки на функциональное состояние ксенографтов и органных культур *in vitro*. Дисс... канд. биол. наук 03.00.19. – Харьков, 2002. – 138с.
- 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.

Mitani F., Suzuki H., Hata J.H. et al. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role // *Endocrinology*. – 1994. – Vol.136, №1. – P. 125-143.

Rainey W.E., Rodgers R.J., Mason J.I. The role of bovine lipoproteins in the regulation of steroidogenesis and HMG-CoA reductase in bovine adrenocortical cells // *Steroids*. – 1992. – Vol.57, №4. – P. 167-173.

Ueno M., Nakashima J., Akita M. et al. Characterization of a newly established cell line derived from human adrenocortical carcinoma // *Int. J. Urol.* – 2001. – Vol.8, №1. – P. 17-22.

**ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР,
ОДЕРЖАНИХ З НАДНИРНИКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ
Юссеф Хані Румієх**

В роботі досліджено базальну та стимульовану секрецію гормонів органотиповими культурами з наднирників білих щурів різного віку (1-, 3-, 6- и 12-місячні), рівень утилізації культурами екзогенного холестерину та життєздатність клітин в культурі. Встановлено, що секретуюча здібність клітин культури і утилізація ними екзогенного холестерину залежить від віку тварини, з тканин якого отримані культури. Максимальну активність мають культури, що одержані з тканин тварин за віком 3-6 місяців. Культури, що отримані з тканин старих тварин (12 місяців), мають меншу активність.

Ключові слова: *органотипові культури наднирників, секреція гормонів, утилізація холестерину, життєздатність, вік тварини.*

**FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ORGANOLTIPIC CULTURES RECEIVED
FROM ADRENAL GLANDS OF THE RATS OF DIFFERENT AGES
Youssef Hani Roumieh**

In this work the basal and stimulated secretion of hormones by organolipic cultures from adrenal glands of the white rats of different ages (1, 3, 6 and 12 months), the level of consumption of the exogenic cholesterol and the vital capacity of the cells in the culture has been studied. We determined that the secretion capacity of the cells of culture and their consumption of exogenic cholesterol depend of the age of animals whom the tissue of which the cultures have been taken. The cultures received from the tissue of animals of 3-6 months old have the maximal activity. The cultures received from the tissue of old animals (12 months) have a less activity.

Key words: *organoltipic cultures of adrenal glands, secretion of hormones, utilization of cholesterol, vital capacity, age of animal.*

Представлено Т.П.Бондаренко
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко