

УДК: 615.361.451.014.41

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАДПОЧЕЧНИКОВ И ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ КУЛЬТУР НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ****Юсеф Хані Румієх, Т.П.Бондаренко***Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

В работе исследован уровень 11-ОКС в плазме крови, надпочечниках и органотипических культурах из тканей надпочечников крыс разного возраста (1-, 3-, 6- и 12-месячные). Установлено, что по мере старения в плазме крови и тканях надпочечников уменьшается уровень гормонов. Секретирующая способность клеток культуры также зависит от возраста животных, из тканей которого получали культуры. Максимальной активностью обладают культуры, полученные из тканей животных 3–6 месяцев. Культуры, полученные из тканей старых животных (12 месяцев) имеют меньшую активность. Обработка культур  $\text{CdCl}_2$  ( $10^{-3}$  М) сопровождалась снижением секретирующей способности на 38–42 % для всех возрастных групп.

Ключевые слова: *надпочечники, органотипические культуры надпочечников, секреция гормонов, хлорид кадмия, возраст животного.*

**Введение**

Известно, что при старении уровень стероидных гормонов в крови млекопитающих снижается (Канунго, 1982). Глюкокортикоиды коры надпочечников необходимы для метаболизма углеводов и белков. Уменьшение их количества при старении может привести к серьезному нарушению обмена веществ в целом. Ключевая роль в этом плане принадлежит глюкокортикоидам, поступающим в кровь, в молекулах которых содержатся гидроксигруппы в 11 положении (11-ОКС) циклопентанпергидрофенантренового ядра. Биологический эффект глюкокортикоидов определяется как способностью связываться с рецепторами, так и их концентрацией в крови (Ehrhart-Bornstein, 1998). Имеются сведения о том, что стероидогенная функция клеток надпочечников во многом определяется внутриклеточными процессами секреции, которые могут быть модифицированы различными веществами. Например, соли кадмия могут изменять доступность холестерина к месту синтеза гормонов (Мельниченко, Фадеев, 1997).

В связи с этим целью данной работы явилось исследование функциональной активности надпочечников белых крыс разного возраста по уровню секреции гормонов в кровь и уровню их в тканях надпочечников, а также по секреции гормонов культурами тканей надпочечников, полученных из эндокринных желез животных разного возраста в присутствии и отсутствии хлорида кадмия. Поскольку на уровне организма весьма сложно ответить на вопросы, связанные с влиянием солей кадмия на доступность холестерина к внутренней поверхности мембран митохондрий, данные эксперименты были проведены на органотипических культурах, получаемых из тканей животных различного возраста.

**Методики**

Исследования были проведены на белых беспородных крысах разного возраста (1-, 3-, 6- и 12-месячных), 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 из организма животных осуществляли с соблюдением строгих правил асептики и антисептики у животных после легкого наркоза эфиром и декапитации. Культивирование проводили по стандартной методике (Тронько и др., 1990) в течение 5-ти суток. Белок определяли по методу Бредфорда (1985). Глюкокортикоиды (11-ОКС) определяли флуориметрическим методом А.Г.Резникова в модификации (Бондаренко и др., 2001). Обработку органотипических культур (ОК) хлоридом кадмия ( $10^{-3}$  М) осуществляли путем инкубации в течении 24 часов при стандартных условиях культивирования как описано в работе (Самченко, 2002). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по методу Стьюдента-Фишера (Зайцев, 1984) с помощью пакета программ Excel и SigmaPlot.

**Результаты и обсуждение**

На первых этапах наших исследований мы провели анализ уровня гормонов в плазме крови и тканях надпочечников у животных разного возраста. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Относительные массы надпочечников и уровень 11-ОКС в плазме крови и тканях надпочечников у белых крыс разного возраста (n=8)

Возраст животных	Исследуемые параметры			
	Масса тела	% массы надпочечников от массы тела	11-ОКС в плазме крови в мкг/мг белка	11-ОКС в тканях надпочечников в мкг/мг белка
1 месяц	88 ± 6	0,013 ± 0,0005	112,28 ± 6,75	1,099 ± 0,041
3 месяца	110 ± 7	0,012 ± 0,0005	104,80 ± 6,21	1,078 ± 0,024
6 месяцев	150 ± 8	0,011 ± 0,0005	102,48* ± 5,64 P<0,05	0,976 ± 0,020
12 месяцев	260 ± 12	0,009* ± 0,0004 P<0,05	99,55* ± 4,01 P<0,05	0,812* ± 0,019 P<0,05

Примечание. \* – данные достоверны относительно показателей для месячных животных

Из представленных данных видно, что по мере старения животных уровень секреции глюкокортикоидов в кровь снижается. Эти данные согласуются со снижением относительной массы самих надпочечников. Существуют сведения о том, что между массой тела и массой эндокринных желез существует определенная корреляция, а масса эндокринной железы зависит в свою очередь от количества вырабатываемых железой гормонов. При анализе уровня гормонов в самой ткани надпочечников в пересчете на белок ткани мы отмечали снижение количества гормонов в самой ткани. Изменение уровня гормонов в крови может отражать как изменение скорости секреции гормонов, так и изменение скорости синтеза гормонов за счет изменения доступности холестерина к месту синтеза гормонов или за счет изменения активности ферментов, участвующих в синтезе (Мельниченко, Фадеев, 1997). Кроме того, изменение концентрации циркулирующих в крови гормонов может быть связано с изменением содержания сывороточного белка, с которым связан гормон (Канунго, 1982). Поскольку на уровень гормонов в крови оказывают влияние процессы, инициируемые гипоталамусом, то, возможно, что при старении могут изменяться процессы, ответственные в гипоталамусе за регуляцию функционирования надпочечников, т.е. синтез и секрецию глюкокортикоидов. При исследованиях, проводимых на целом организме, достаточно сложно ответить на вопросы, касающиеся причин изменения тех или иных процессов синтеза или секреции гормонов. В настоящее время является доказанным, что эндокринные клетки в случае сохранения своей структурной целостности и растущие вне организма могут не только секретировать соответствующие гормоны, но и при наличии в среде культивирования экзогенных предшественников синтеза гормонов их потреблять для продукции гормонов (Ueno et al., 2001). Это подтверждается и нашими данными, полученными по утилизации экзогенного холестерина ОК из тканей надпочечников белых крыс (Юссеф Хани Румиех, 2005), а также данными других исследователей, полученными для ОК из надпочечников новорожденных поросят (Самченко, 2002). Исходя из этого, следующим этапом наших экспериментов стали эксперименты по секреции 11-ОКС органотипическими культурами, полученными из тканей надпочечников крыс разного возраста в отсутствие и в присутствии ингибитора доступности холестерина к внутренней поверхности мембран митохондрий, где осуществляется биосинтез глюкокортикоидов. Использование хлорида кадмия, на наш взгляд, позволит ответить на вопросы об изменении доступности холестерина в клетки. Это обусловлено тем, что данные литературы указывают на то, что хлорид кадмия способен модифицировать внутриклеточные процессы секреции клеток путем действия на ключевые этапы синтеза гормонов. В предыдущих наших исследованиях (Юссеф Хани Румиех, 2005) было показано, что с возрастом изменяется скорость утилизации культурами из среды экзогенного холестерина – источника синтеза глюкокортикоидов. На сегодня нет сведений о том, как будет влиять хлорид кадмия на клетки, модифицированные в процессе онтогенеза. Полученные данные представлены в табл. 2. Из представленных данных видно, что для всех ОК, получаемых из тканей животных всех исследуемых возрастных групп, при действии хлорида кадмия характерно угнетение секреции гормонов. Эти изменения достоверны относительно данных для соответствующих контрольных образцов без обработки ингибитором. Если за 100% принять уровень секреции в образцах, которые не подвергались обработке  $CdCl_2$ , то угнетение секреции для всех образцов находилось на уровне 38–

42 %. То есть мы не наблюдали достоверных различий, связанных с процессами, развивающимися в онтогенезе тканей надпочечников, которые обусловлены действием ингибитора. Это может означать, что не происходит изменений участков мембраны, через которые реализуется действие хлорида кадмия.

Полученные результаты, скорее всего, свидетельствуют в пользу того, что с возрастом происходят изменения, связанные с уменьшением синтетических процессов образования гормонов, что подтверждается нашими данными по утилизации экзогенного холестерина (Юсеф Хані Румієх, 2005), но не наблюдается различий в доступности холестерина к местам синтеза гормонов. В связи с этим нам виделось целесообразным проанализировать количество гормонов, оставшихся в клетках после секреции. Для этих целей мы удаляли культуральную среду центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), а из полученных осадков готовили 10% гомогенаты, в которых определяли 11-ОКС. Полученные данные представлены в табл. 3.

**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 секреции 11-ОКС в мкг/мг белка после обработки $CdCl_2$ ( $10^{-3}$ М)
1-месячные животные	$0,320 \pm 0,015$	$0,192 \pm 0,005$ P<0,05
3-месячные животные	$0,341 \pm 0,016$	$0,205 \pm 0,011$ P<0,05
6-месячные животные	$0,337 \pm 0,014$	$0,222 \pm 0,012$ P<0,05
12-месячные животные	$0,250 \pm 0,013$	$0,153 \pm 0,03$ P<0,05

**Таблица 3.**  
**Уровень 11-ОКС в клетках ОК, обработанных хлоридом кадмия, после секреции (n=7)**

Возраст животного	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
11-ОКС в мкг/мг белка	$0,280 \pm 0,015$	$0,292 \pm 0,017$	$0,285 \pm 0,016$	$0,245 \pm 0,011$ P<0,05

Из представленных данных видно, что у старых животных в клетках органотипических культур из надпочечников белых крыс после секреции остается меньше гормонов, чем в клетках молодых и половозрелых животных. Это является косвенным подтверждением того, что в процессе онтогенеза тканей надпочечников происходит изменение скорости биосинтетических процессов. Поскольку биосинтез гормонов регулируется гипоталамусом, то наблюдаемые изменения могут быть обусловлены процессами, развивающимися в онтогенезе тканей гипоталамуса. Имеются сведения о том, что в тканях головного мозга мышей, крыс и морских свинок после 2–3 месяцев развития происходит накопление старческого пигмента, которое с возрастом возрастает. Коррекция его количества путем введения центрофеноксина способствует не только улучшению обучаемости и памяти 12-месячных мышей, но и продлению жизни животных (Канунго, 1982). Возможно, что накопление этого старческого пигмента может сказываться и на процессах регуляции биосинтеза гормонов.

#### **Выводы**

Из представленных данных можно сделать заключение о том, что в онтогенезе тканей надпочечников происходят изменения, связанные со снижением синтетической активности образования гормонов. Об этом свидетельствуют данные о снижении уровня гормонов, как в плазме крови, так и в тканях надпочечников, а также и в органотипических культурах, получаемых из тканей старых животных.

**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.
- Зайцев Т.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии. – М.: Наука, 1984. – 424с.
- Канунго М. Биохимия старения М.: Мир, 1982. – 294с.
- Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Основы лабораторной диагностики надпочечниковой недостаточности // Клиническая лаб. диагностика. – 1997. – №8. – С. 26–32.
- Самченко И.И. Влияние криоконсервирования и условий обработки на функциональное состояние ксенографтов и органных культур надпочечников in vitro. Дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 2002. – 138с.
- Тронько Н.Д., Рыбаков С.И., Комиссаренко И.В. и др. Лечение хронического гипокритицизма методом трансплантации культур клеток коры надпочечных желез. Метод. рекомендации – К.: Изд-во Минздрав Украины, 1990. – 24с.
- Юссеф Хани Румиех Функциональные характеристики органотипических культур, полученных из надпочечников крыс разного возраста // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. – 2005. – №709. – С. 134–139.
- Ehrhart-Bornstein M., Hinson J.P., Bornstein S.R. et al. Intraadrenal interaction in the regulation of adrenocortical steroidogenesis // Endocr. Rew. – 1998. – Vol.19, №2. – P. 101–103.
- 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 НАДНИРНИКІВ І ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР  
НАДНИРНИКІВ ЩУРІВ ПРИ СТАРІННІ  
Юсеф Хані Румієх, Т.П.Бондаренко**

В роботі досліджено рівень глюкокортикоїдних гормонів в плазмі крові та тканинах наднирників у білих щурів різного віку, а також рівень секреції гормонів органотиповими культурами з наднирників білих щурів різного віку (1-, 3-, 6- і 12-місячні) за умов обробки хлоридом кадмію ( $10^{-3}$  М). Встановлено, що за умов старіння в плазмі крові та тканинах наднирників зменшується концентрація гормонів. Хлорид кадмію пригнічує секретуючі властивості культур, однак вони не залежні від віку тварин. Встановлені зміни пов'язані із зменшуванням рівню метаболізму тканини, а саме, із знижуванням рівню синтезу гормонів.

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

**FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ADRENAL GLANDS AND ORGANOLTIPIC CULTURES  
OF ADRENAL GLANDS OF THE RATS AT AGING  
Youssef Hani Roumieh, T.P.Bondarenko**

In this work the level of 11-OKS in blood plasma, adrenal glands and organoltipic cultures from tissues of adrenal glands of rats of different ages (1, 3, 6 and 12 months) has been studied. The level of hormones in blood plasma and adrenal glands tissues has been shown to decrease at aging. Secretion capacity of culture cells also depends on the age of animals from 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. Treatment of cultures with  $CdCl_2$  ( $10^{-3}$  M) has resulted in 38–42 % decreasing of secretion capacity for all age groups.

Key words: *adrenal glands, organoltipic cultures of adrenal glands, secretion of hormones, cadmium chloride, age of an animal.*

Представлено Є.О.Гордієнком  
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко