

С.Л. Токар, Л.М.Коваль, О.О.Лук'янець, О.М. Яворська

Особливості ультраструктури культуральних клітин кори надниркових залоз щура у нормі та після аплікації кальцієвого іонофора A23187 та адренкортикотропного гормону

Исследовали ультраструктуру клеток пучково-сетчатой зоны коры надпочечников крысы в норме и после аппликации адренкортикотропного гормона АКТГ или кальциевого ионофора A23187. В контроле было выявлено три типа клеток, которые отличались своей ультраструктурой. Аппликация АКТГ или ионофора A23187 приводила к нивелиции различий в ультраструктуре клеток разных типов, при этом все клетки приобретали морфологические признаки ускоренного стероидогенеза. Обговаривается вероятная роль клеток с разными типами ультраструктуры для работы пучково-сетчатой зоны коры надпочечников, а также вероятное участие ионов кальция в опосредовании влияния АКТГ на ультраструктуру секреторных клеток пучково-сетчатой зоны коры надпочечников.

ВСТУП

Основною функцією секреторних клітин кори надниркових залоз є синтез таких стероїдних гормонів, як кортизол, альдостерон, кортикостерон тощо. Починаючи із 50–60-х років минулого сторіччя було проведено багато досліджень, що дозволило виявити основні ферменти, які беруть участь у стероїдогенезі. Також встановлено, що послідовні стадії стероїдогенезу відбуваються у різних компартментах клітини. Загальним попередником усіх типів стероїдних гормонів є холестерол який депонується головним чином у ліпідних краплях. Для участі у першій реакції стероїдогенезу холестерол транспортується до внутрішньої мембрани мітохондрії, де він перетворюється на прегненолон за допомогою особливого ферменту (цитохрому P_{450_{sc}}) та системи транспортування електронів, до якої входять ферредоксин та ферредоксин оксидоредуктаза. Наступне перет-

ворення прегненолону на прогестерон або на 17-окси-прегненолон відбувається на мембранах гладенького ендоплазматичного ретикулума (гЕПР). Вважається, що на мембранах гЕПР проходять також інші реакції стероїдогенезу, але для синтезу альдостерону та кортизолу проміжні продукти стероїдогенезу: 11-дезоксикортикостерон та 17 α -окси-11-дезоксикортикостерон повинні знову потрапити на внутрішню мембрану мітохондрій, де відбуваються останні стадії стероїдогенезу. Після проходження усіх перетворень готова молекула стероїдного гормону потрапляє у позаклітинне середовище і далі до кров'яного русла. Таким чином, важливу роль у процесі стероїдогенезу відіграє не тільки наявність ферментних систем та їх кофакторів, але також і взаємодія між різними компартментами клітини. На жаль, особливості взаємодії різних органел, які беруть участь у стероїдогенезі, а також механізми, що її регулюють, недостатньо вивчено. Метою

© С.Л. Токар, Л.М.Коваль, О.О.Лук'янець, О.М. Яворська

нашої роботи було дослідження особливостей ультраструктури клітин кори надниркової залози у нормі та після аплікації стимулятора стероїдогенезу адренокортикотропного гормону (АКТГ) і кальцієвого іонофору А23187.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на однодобовій культурі клітин кори надниркових залоз щура. Методика приготування культури описана раніше [3]. Покривні скельця із культурою занурювали у розчин Рінгера, який також містив фрагмент молекули АКТГ, що складався з 4–10 амінокислотних залишків нативної молекули у концентрації 10 ммоль/л. Через 10 хв клітини фіксували та підготовляли для електронно-мікроскопічних досліджень за описаною раніше методикою [3]. Аплікацію іонофору А23187 проводили за іншою схемою: скельця із культурою клітин на 30 хв занурювали у безкальцієвий розчин, що також містив іонофор А23187, далі клітини на 30 с поміщали у розчин Рінгера, що містив 2,5 ммоль/л CaCl_2 . Після цього клітини фіксували та готували для електронно-мікроскопічних досліджень. Для розрахунків площі органел ми використовували комп'ютерну програму Kslite ("Kontron Elektronik" FRG). Формули, за якими розраховували інші морфометричні показники було наведено раніше [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження дозволили виділити три морфологічні типи клітин пучково-сітчастої зони кори надниркових залоз. Неоднорідність морфологічної будови клітин цієї зони описано раніше [1]. Але детально це питання не обговорювалось. Дослідження також показали, що відмінність ультраструктури клітин різних типів найбільше стосується будови тих органел, що безпосередньо беруть участь у стероїдогенезі. Так, мембрани гЕПР у клітинах

1-го типу були значно краще організовані, та їх було помітно більше, ніж у клітинах інших типів. Мітохондрії у клітинах 1-го типу мали щільний матрикс і велику кількість везикулярних крист. Такі особливості будови передбачають можливість того, що клітина активно синтезує стероїдні гормони. Клітини 2-го типу відрізнялися меншою кількістю організованих у сітку мембран гЕПР. Мітохондрії у цих клітинах порівняно з оточуючою їх цитоплазмою мали більш світлий матрикс, при цьому трубчасті кристи зустрічалися частіше, ніж везикулярні. Такі особливості будови клітин 2-го типу свідчать про те, що їх стероїдогенна активність може бути зменшена відносно клітин 1-го типу. Дослідження електроннограм клітин 3-го типу показало помітне зменшення кількості організованих у сітку мембран гЕПР та мітохондрій щодо інших типів клітин пучково-сітчастої зони. При цьому мітохондрії мали світлий матрикс, у якому можна було побачити головним чином трубчасті кристи. Разом з тим у клітинах 3-го типу діаметр ліпідних крапель був достовірно більшим, ніж у клітинах інших типів (табл. 1). Така особливість будови клітини свідчить про пригнічення процесів стероїдогенезу [2]. Таким чином, ми можемо зробити припущення, що саме функціональна активність клітини лежить у основі відмінності різних морфологічних типів клітин кори надниркових залоз, отриманих у досліджуваній культурі. Для перевірки цього припущення було проаналізовано вплив на ультраструктуру цих клітин загальновідомого стимулятора стероїдогенезу АКТГ. В іншій серії дослідів для вивчення ролі іонів кальцію у регуляції ультраструктури ми використали кальцієвий іонофор А23187. Вплив АКТГ та кальцієвого іонофору А23187 на ультраструктуру досліджуваних клітин були багато у чому подібним. На електроннограмах, отриманих після аплікації АКТГ або кальцієвого іонофору, клітини з різними типами ультраструктури не спостерігались, навпаки, всі

Таблиця 1. Порівняння морфометричних показників у різних типах секреторних клітин пучково-сітчастої кори надниркових залоз щура (M±m)

Типи клітин	Середній діаметр ліпідних крапель, нм	Щільність розташування ліпідних крапель, мкм ²	Площа компартменту ліпідних крапель (% від площі цитоплазми)	Середня площа мітохондрій, мкм ²	Щільність розташування мітохондрій, мкм ²	Площа компартменту мітохондрій, % від площі цитоплазми
1-й	831,0±18,0	0,304±0,071	16,9±2,8	0,547±0,016	1,111±0,047	30±1,8
2-й	616,1±43,7	0,333±0,169	11,0±6,0	0,317±0,021 *** (P 1,3)	1,736±0,458	27,7±4,1
3-й	1057,6±38,6 *** (P1,2)	0,252±0,027	26,4±4,1	0,551±0,026	0,619±0,105 *** (P 1)	18,4±1,7 *** (P 1,2)
Середні значення	909,6±20,3	0,291±0,038	21,3±2,5	0,523±0,013	0,923±0,089	24,4±1,8

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

вони мали подібні морфологічні ознаки. При дослідженні впливу АКТГ або іонофору A23187 ми спостерігали подібні зміни у компартменті мітохондрій: мітохондрії завжди містили головним чином везикулярні кристи та дуже невелику кількість трубчастих крист, що були помітно розширеними, причому від них відділялись нові везикули. За умов інкубації з АКТГ також зменшувався середній діаметр, та одночасно зростала щільність розташування мітохондрій у цитоплазмі (табл. 2). Що свідчить про прискорення їх поділу. Цікавим є те, що у досліджуваних клітинах прискорення поділу мітохондрій можна було виявити вже після десятихвилинної аплікації АКТГ. Інші автори також відмічали здатність АКТГ стимулювати поділ мітохондрій, але, як правило, зміни аналізувалися через декілька

годин або навіть дів після аплікації гормону [4]. Одним із найбільш важливих призначень стероїдних гормонів, що синтезуються у пучково-сітчастій зоні кори надниркових залоз є адаптація організму до умов стресу. Відомо, що після виникнення стресового стану прискорюється синтез стероїдних гормонів, отже внутрішньоклітинні механізми, що забезпечують швидку активізацію стероїдогенезу мають дуже важливе значення для функціонування організму у цілому. На наш погляд, одним із проявів дії таких механізмів може бути активізація поділу мітохондрій. Можливо, цей процес у перші 10 хв після аплікації АКТГ має значення для прискорення переносу холестеролу та проміжних продуктів стероїдогенезу через мембрани мітохондрій внаслідок збільшення загальної площі цих мембран.

Таблиця 2. Порівняння зміни морфометричних показників у різних типах секреторних клітин пучково-сітчастої зони кори надниркових залоз щура після аплікації експериментальних речовин (M±m)

Показник	Середній діаметр ліпідних крапель, нм	Щільність розташування ліпідних крапель, мкм ²	Площа компартменту ліпідних крапель (% від площі цитоплазми)	Середня площа мітохондрій, мкм ²	Щільність розташування мітохондрій, мкм ²	Площа компартменту мітохондрій, % від площі цитоплазми
Контроль	909,6±20,3	0,291±0,038	21,3±2,5	0,523±0,013	0,923±0,089	24,4±1,8
АКТГ	692,9±9,6***	0,644±0,086***	26,7±2,5	0,446±0,012***	1,301±0,064**	29,4±2,2
A23187	751,7±12,9***	0,793±0,136***	40,2±4,2***	0,355±0,013***	1,096±0,101	19,1±1,4

** P<0,01; *** P<0,001.

Після аплікації АКТГ та іонофору А23187 спостерігалось також збільшення кількості мембран гЕПР, зв'язаних між собою у розгалужену сітку. Відомо, що мембрани гЕПР здатні дуже швидко змінювати свою структуру залежно від потреб клітини. При цьому збільшення кількості мембран гЕПР у клітинах кори надниркових залоз супроводжує прискорення стероїдогенезу. Відомо, що мембрани гЕПР є тим компартментом, у якому розташовуються ферменти, що беруть участь у стероїдогенезі, а саме цитохроми P_{450c17} та P_{450c21}. Отже, можна припустити, що збільшення кількості мембран гЕПР, під час активації стероїдогенезу, дозволяє залучити до стероїдогенезу більшу кількість ферментів, а також збільшити загальну кількість необхідних для їх функціонування коферментів та кофакторів. З іншого боку, утворення сітки зв'язаних між собою каналів може полегшити транспортування проміжних продуктів стероїдогенезу між різними органелами, що беруть участь у ланцюжку біохімічних перетворень. Так, після аплікації АКТГ помічено істотне підсилення взаємодії між гЕПР та ліпідними краплями. При цьому мембрани гЕПР утворювали багаточисельний чохол навколо ліпідних крапель. Відомо, що у ліпідних краплях депонується холестерол, тоді як у мітохондріях відбувається перший етап стероїдогенезу [6]. Можливо, наявність щільних контактів гЕПР із мітохондріями з одного боку, а з ліпідними краплями з іншого, може мати значення для перенесення холестеролу від ліпідних крапель до місця першої реакції стероїдогенезу у мітохондріях. Це припущення підтверджується даними, отриманими Mendis-Handagama [5], який показав, що у нестимульованих лютеїнізуючим гормоном клітинах Лейдіга холестерол виявляється лише у ліпідних краплях та плазматичній мембрані, тоді як після аплікації гормону також у мембранах гЕПР і мітохондріях.

Одночасно аплікація АКТГ та іонофору А23187 викликали певні зміни у розта-

шуванні мембран гЕПР. Так, за умов експерименту структури гЕПР часто розташовувалися біля плазматичної мембрани клітини. Раніше [10] зроблено припущення про можливу участь гЕПР у перенесенні синтезованих стероїдних гормонів у позаклітинне середовище. Але, на жаль, це припущення не було перевірене та мало обговорювалося у літературі. На отриманих нами електроннограмах було видно, що канали гЕПР могли з'єднуватися з клітинною мембраною та відкриватися у міжклітинну порожнину. Виходячи з того, що мембрани гЕПР щільно зв'язані з мітохондріями, де відбуваються завершальні етапи синтезу стероїдних гормонів, можна вважати, що отримані результати свідчать на користь припущення про можливу участь мембран гЕПР у перенесенні стероїдних гормонів до позаклітинного середовища.

Таким чином, перебудова ультраструктури гЕПР у клітинах кори надниркових залоз щура після аплікації АКТГ та кальцієвого іонофору А23187, можуть бути важливими для швидкого прискорення стероїдогенезу. А це вимагає подальшого розуміння механізмів стероїдогенезу, більш детального вивчення взаємозв'язку структури та функції гЕПР у клітинах кори цих залоз.

Аплікація АКТГ та іонофору викликала достовірне зменшення діаметра ліпідних крапель, та збільшення щільності розташування у цитоплазмі, що можна пояснити їх дробленням (див.табл. 2). Підтвердженням процесу дроблення ліпідних крапель можна вважати й існування подвійних крапель, майже повністю з'єднаних між собою або зв'язаних неширокими місточками. Отже, за умов здійсненого експерименту наявність таких структур може збігатися з різними стадіями дроблення краплі. Дроблення ліпідних крапель, як і поділ мітохондрій, може бути доцільним з точки зору збільшення загальної площі поверхні контакту між компартментом ліпідних крапель та навколишньою цитоплазмою. Відомо, що саме на цій поверхні відбуваєть-

ся взаємодія між гормончутливою ліпазою (ферментом, що сприяє мобілізації холестеролу для потреб стероїдогенезу) та естерифікованим холестеролом, що знаходиться у матриксі ліпідної краплі [9]. Разом з тим залишається нез'ясованим питання про те, яким чином під час дроблення відбувається збільшення площі мембрани ліпідних крапель, що являє собою моношар фосфоліпідів. Можливо, до цього процесу залучаються структури гЕПР, котрі інтенсивно взаємодіяли з ліпідними краплями.

Таким чином, після аплікації АКТГ найбільш сильно змінювалася ультраструктура клітин 3-го типу, тоді як будова клітин 1-го типу зазнавала найменшого впливу. Це може бути пов'язаним із тим, що ультраструктура клітин 1-го типу вже знаходилася у активному стані, а додаткова стимуляція не викликала значних змін. Одночасно клітини 3-го типу під час переходу у більш активний стан змінювалися набагато сильніше. Отже, наші результати підтверджують припущення про те, що різниця у будові отриманих нами у культурі клітин пучково-сітчастої зони, пов'язана перш за все із різними функціональними станами цих клітин і не є строго детермінованою. Тому у живому організмі частина клітин кори надниркових залоз може знаходитись у активному стані та синтезувати стероїдні гормони, тоді як у інших клітинах процеси стероїдогенезу можуть бути загальмованими. Отже клітини останнього типу можуть виконувати резервні функції, переходячи у активний стан під впливом зовнішніх стимулювальних факторів, наприклад при збільшенні концентрації АКТГ у крові. З іншого боку, важливу роль у регуляції ультраструктури клітин пучково-сітчастої зони кори надниркових залоз шура можуть відігравати іони кальцію. Раніше у нашій лабораторії було показано, що аплікація АКТГ збільшує концентрацію іонів кальцію у цитоплазмі цих клітин [8]. Таким чином, іони кальцію можуть також виступати у

ролі вторинних посередників, що регулюють зміни в ультраструктурі секреторних клітин кори надниркових залоз після аплікації АКТГ.

Таким чином, на нашу думку, подальше вивчення процесу стероїдогенезу вимагатиме комплексного підходу, в якому важливе місце буде належати вивченню структури та функції окремих органел, що беруть участь у стероїдогенезі, їх здатності взаємодіяти між собою, а також пошукам внутрішньоклітинних механізмів, що керують цими процесами і, зокрема, механізмів, що залежать від вмісту іонів кальцію в цитоплазмі.

**S.L. Tokar, L.M. Koval, E.A. Lukynetz,
E.N. Yavorskaya**

FEATURES OF CULTURAL RAT ADRENOCORTICAL CELLS ULTRASTRUCTURE IN NORM AND AFTER ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE OR CALCIUM IONOPHORE A23187 APPLICATION

The ultrastructure of a fasciculata-reticularis zone cells of a rat adrenal cortex in norm, and after application of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and calcium ionophore A23187 was investigated. In the control it has been revealed three types of cells which differed on the ultrastructure. ACTH or ionophore A23187 application resulted in disappearance of a difference in ultrastructure of cells of different types, also all cells got morphological attributes of accelerated steroidogenesis. The probable role of cells with different types of ultrastructure for fasciculata-reticularis zone function, and also prospective participation of calcium ions in ACTH influences on ultrastructure of a fasciculata-reticularis zone is discussed.

Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev;

International Center for Molecular Physiology, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гордиенко В.М., Козырецкий В.Г. Ультраструктура желез эндокринной системы. – К.: Здоров'я, 1978. – 137с.
2. Andreis P.G., Rebuffat P., Belloni A.S. Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells: zona fasciculata/reticularis cells of chronically ACTH-treated rats// Cell Tissue Res. – 1989. – **258**, №1. – P.43–51.
3. Koval L.M., Yavorskaya E.N., Lukianetz E.A. Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures// Neuroscience. – 2000. – **96**. – P.639–649.

4. Mazzocchi G., Robba C. Belloni A.S. et al. Investigations on the turnover of adrenocortical mitochondria. IV. A stereological study of the effect of chronic treatment with ACTH on the size and number of rat zona reticularis mitochondria// Cell Tissue Res. – 1976. – **168**. – P.1–9.
5. Mendis-Handagama S.M. Peroxisomes and intracellular cholesterol trafficking in adult rat Leydig cells following// Tissue Cell. – 2000. – **32**, № 1. – P.102–106.
6. Stocco D.M., Clark B.J. The requirement of phosphorylation on a threonine residue in the acute regulation of steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig cells// J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1993. – **46**, № 3. – P.337–347.
7. Tokar S.L., Koval L.M., Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Changes in the ultrastucture of adrenocortical cells induced by cholinergic agonists// Нейрофізіологія/Neurophysiology. – 2002. – **34**, №2/3. – P.257–259.
8. Tokar S.L., Koval L.M., Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Role of calcium ions in ultrastructural changes evoked by adrenocorticotropic hormone in rat adrenocortical cells - In: Second Bogomoletz - Nencki Symposium "Intracellular signaling in excitable cells" Kiev, Ukraine.- September 1-3, 2002.- P. 16-17.
9. Wen-Jun Shen, Vanita Natu, Shailja Patel, Jun-ichi Oshuga, Shun Ishibashi, Salman Azhar. Adrenal Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase: Identification, Subcellular Distribution, and Sex Differences// Endocrinology. – 2002. – **143**,№ 3. – P.801–806.
10. Yoshimura F., Harumya K., Watanable M., Omoto T., Sekiguchi T. et al. Functional significan of the tybular agranular endoplasmic reticulum in the adrenocortical cells of albino rats // Endocrinol. J. – 1968. – **15**,№ 2. – P.145–169.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 25.02.2004