

УДК 616.43:611.441: 576.31:591.481.2

Г.Г. Борецький, І.М. Рожков

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ ЗМІН КОРТИКОТРОПНИХ КЛІТИН АДЕНОГІПОФІЗУ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ДІЇ ЧЕРВОНОГО ШЛАМУ

За допомогою сучасних методів (електронна мікроскопія, морфометрія з використанням оптичного аналізу зображень) отримані нові дані відносно характеру і динаміки ультраструктурних змін в кортикотропних клітинах аденогіпофізу за умов тривалої дії на організм червоного шламу, що є відходом алюмінієвого виробництва. Встановлена залежність змін ультраструктури і функції кортикотропних клітин аденогіпофізу від тривалості дії червоного шламу у тварин різного віку.

Ключові слова: аденогіпофіз, кортикотропні клітини, ультраструктура, червоний шлам.

Постановка проблеми. Вивчення процесів адаптації організму до дії різноманітних факторів навколишнього середовища є актуальною проблемою сучасної теоретичної і практичної біології та медицини, оскільки знання закономірностей цього процесу сприяють збереженню і підтримці високого рівня працездатності і здоров'я людини та тварин.

Як правило, більшість шкідливих факторів навколишнього середовища діють на організм з малою інтенсивністю, однак поєднання під час досить слабких, але односпрямованих дій токсикантів різної хімічної природи роблять суттєвий ризик порушення функцій організму в результаті напруження різних систем адаптації досить вагомим [1, 2, 3, 4].

Відомо, що центральною ланкою в здійсненні пристосувальних змін в організмі до дії шкідливих речовин, у тому числі і червоного шламу є ендокринний апарат, зокрема гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система.

Кортикотропні клітини аденогіпофізу є одними з основних біологічних структур системи адаптації, надзвичайно чутливими до різного роду екзогенних та ендогенних модуляторів. Ці клітини приймають безпосередню участь в опосередкування гострих і хронічних стресорних нейроендокринних реакцій на пошкодження [1, 2, 5, 6, 7].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Опрацювання фахової літератури показало, що морфофункціональні зміни органів ендокринної системи за умов різноманітних патологічних станів, а також під впливом токсичних речовин неодноразово висвітлювалося в сучасній літературі [2, 3, 4, 6, 8, 9]. При цьому, аналіз джерел літератури свідчить про фрагментарність і недостатність вивчення питань морфологічних і функціональних змін в кортикотропних клітинах аденогіпофізу при тривалій дії червоного шламу в різні вікові періоди тварин, особливо на ультраструктурному рівні.

Мета статті: оцінити динаміку ультраструктурних змін і напрямку репаративних процесів в кортикотропних клітинах аденогіпофізу у тварин різного віку при дії на організм червоного шламу.

Методика

Робота проведена на 60 нелінійних білих щурах-самцях різного віку: 14-, 45- і 180-добові (контрольна і піддослідна групи). Тривала дія червоного шламу на організм щурів досягала щоденним перебуванням тварин на шламовій підстилці товщиною 5-7 мм (з щотижневим оновленням), починаючи з дня народження. Утримання і використання лабораторних тварин відповідало правилам «Європейської

конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною метою та іншою науковою метою, а також методам, що рекомендовані національними нормами з біоетики і проведені у відповідності з Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI от 15.12.2009).

Для вивчення ультраструктури кортикотропних клітин аденогіпофізу маленькі шматочки гіпофізів фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіду. Відповідно до загальноприйнятої методики проводили зневоднення і заливку матеріалу в смолу. Ультратонкі зрізи товщиною 50 – 60 нм отримували на ультратомі LKB – 3 (Швеція). Фарбували їх 2% розчином ураніацетату на 70% етанолі та цитратом свинцю. Препарати вивчали з використанням електронного мікроскопу GEM – 100CX (Японія).

Для встановлення ультраструктурних закономірностей кортикотропів аденогіпофізу проводили морфометричну обробку електроннограм на комп'ютерному аналізаторі зображень IBAS-2000 фірми OPTON (Німеччина) де визначали: площу хроматину в ядрах клітин (SX, %); площу, яку займали мітохондрії (SM, %); площу секреторних гранул (SG, %); вираховували індекс співвідношення активних гранул до неактивних в цитоплазмі клітин (ІАН)[7].

Концентрацію адренкортикотропного гормону (АКТГ) визначали «двоступеневим» імуноферментним методом для виміру біологічно активної молекули АКТГ використовуючи тест-набір фірми Biometrica (США).

Варіаційно–статистичну обробку всіх отриманих показників експерименту здійснювали за методом Стьюдента – Фішера за допомогою комп'ютерних програм Excel-2000, Sigma Plot з обробкою графічних зображень [10, 11].

Результати та їх обговорення

Дослідженнями встановлено, що в аденогіпофізі 14-добових щурів після дії червоного шламу (при електронномікроскопічному вивченні зрізів) виявлялись нечисленні кортикотропні клітини кутастої або зірчастої форм. В цитоплазмі окремих кортикотропів відмічались ознаки дегрануляції. Незначна кількість секреторних гранул спостерігалась уздовж клітинної мембрани, тоді як в інших ділянках цитоплазми гранули мали дещо більші розміри і не містили характерної облямівки.

У цитоплазмі кортикотропів мітохондрії мали подовжену форму, однак також можна було бачити округлої, а зрідка і поліморфної форм. Матрикс мітохондрій дрібнозернистий, кристи орієнтовані поперечно, але вони були нечіткі, а в деяких мітохондріях і зовсім не спостерігались, або були лізовані. Відмічалась нерівномірність щільності цитоплазми, слабкий розвиток ендоплазматичної сітки, яка була представлена, в основному, невеликими вакуолями і короткими канальцями. В окремих клітинах комплекс Гольджі не виявлявся.

Ядра в кортикотропах досить великих розмірів і неправильної форми, часто їх поверхня містила численні інвагінації. В ядрах переважав еухроматин, а в деяких клітинах відмічалась невелика кількість пристінно-розташованого гетерохроматину. Ядерні пори були розширені, а міжмембранні простори не визначались. Ядерце частіше одне, розташовувалось ексцентрично. Воно мало округлу форму і чіткі обриси, іноді з просвітленнями по периферії. Між кортикотропами можна було бачити розширені простори і роз'єднанні міжклітинні контакти (рис. 1).

Дані морфометричних показників кортикотропів піддослідних тварин свідчили про ознаки посилення функціонального напруження, що супроводжувалось збільшенням в ядрах - площі хроматину (на 18,1%), в цитоплазмі - площі мітохондрій (на 16,6%), площі гранул (на 21,2%), зростання індексу співвідношення активних гранул до неактивних (на 24,2%). Рівень АКТГ в периферичній крові підвищувався на 27,0%, порівняно з контролем (табл.1).

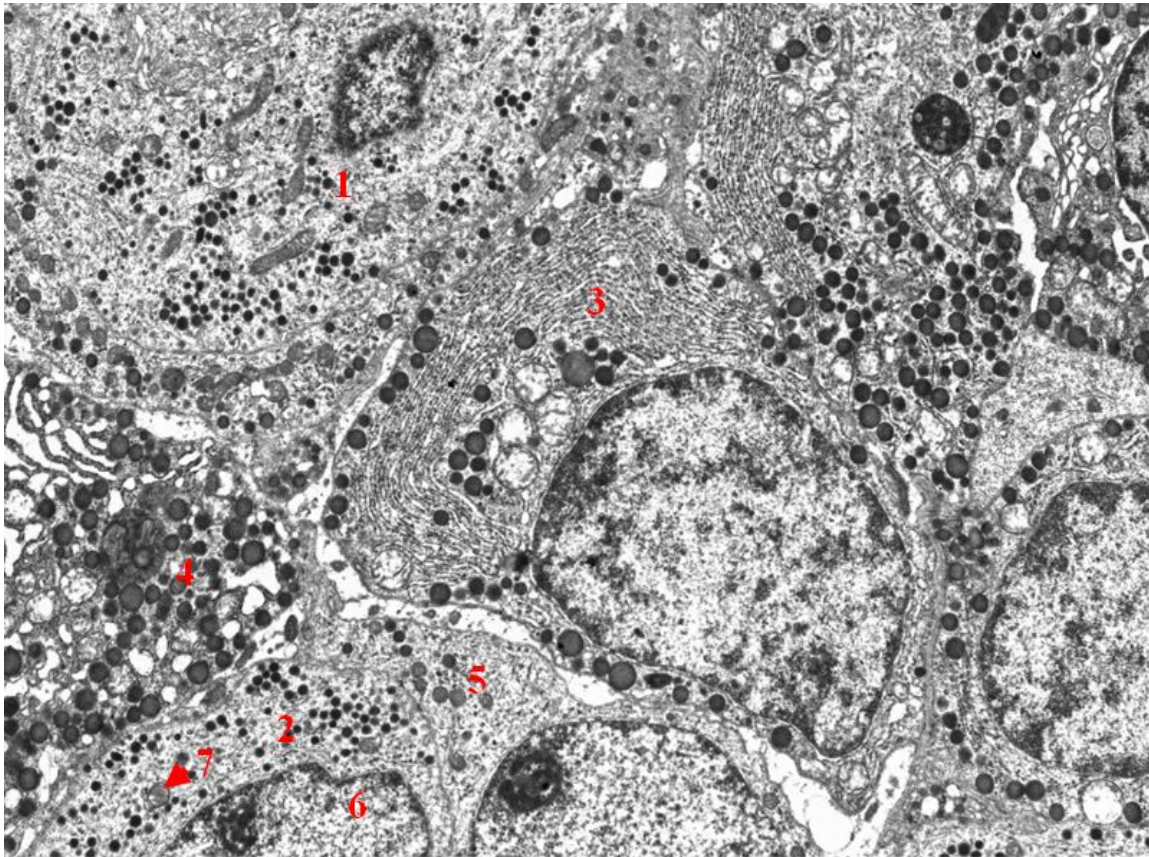


Рис. 1. Електронограма. Аденогіпофіз 14-добового підслідного шура. Контакт кортикотропів(1, 2) з лактотропами (3, 4) і гонадотропом (5). В цитоплазмі кортикотропа (1) ознаки дегрануляції. В ядрі кортикотропа (2) переважання еухроматину надгетерохроматином (6). Мітохондрії округлої форм з нечіткими кристами (7). В кортикотропах слабкий розвиток гранулярної ендоплазматичної сітки і апарату Гольджі. x 10 000.

Таким чином, у 14-добових шурів в результаті тривалого впливу червоного шламу структурні зміни кортикотропів свідчили про підвищення функціональної активності цих клітин. Однак в ультраструктурі деяких кортикотропів відмічалась дегрануляція цитоплазми з ознаками зниження функції ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі і порушень мітохондрій.

У 45-добових тварин після дії червоного шламу при електронномікроскопічному вивченні зрізів аденогіпофіза у більшості кортикотропів виявлялась світла, слабо структурована цитоплазма, яка містила невелику кількість дрібних секреторних гранул, що утворювали скупчення навколо ядра. Гранули виявлялись різного ступеню зрілості, але серед них не було характерних для кортикотропів гранул із світлим ободком. Окремі гранули знаходились в стані зернистого розпаду. У цитоплазмі кортикотропів відмічались розширені порожнини ендоплазматичної сітки, на мембранах яких можна було бачити невелику кількість зв'язаних рибосом. Останні зустрічались як у вигляді скупчень, так і поза зв'язком з мембранами. Ядро займало великий об'єм цитоплазми, в якому примембранно визначалось невелике скупчення гетерохроматину. Міжмембранна щілина була рівномірною, можна було бачити пори.

Таблиця 1

Морфометричні показники стану внутрішньоклітинних органел і активності секреторних гранул в кортикотропних клітинах аденогіпофізу, а також вмісту АКТГ в периферичній крові ($M \pm m$ / $n=10$) після тривалої дії червоного шламу

Показники	Вік тварин, дів					
	14	Відхилення від контролю, %	45	Відхилення від контролю, %	180	Відхилення від контролю, %
Площа хроматину, (SX), %	38,5±2,6	+18,1	49,0±1,2	+16,7	40,1±2,5*	-29,4
	32,6±3,1		42,0±2,6		56,8±2,1	
Площа мітохондрій, (SM), %	47,8±5,0	+16,6	51,0±2,0	+14,1	50,3±0,9	-11,6
	41,0±1,8		44,7±2,6		56,9±2,0	
Площа гранул, (SG), %	24,6±1,9	+21,2	33,1±2,5	+14,5	26,3±2,7*	-28,5
	20,3±2,6		28,9±2,1		36,8±2,5	
Індекс співвідношення активних гранул до неактивних (ІАН)	5,6±2,0	+24,2	6,2±2,1	+14,8	5,8±0,9	-15,9
	4,5±0,8		5,4±2,0		6,9±3,8	
Вміст АКТГ (п/моль/л)	5,1±0,34*	+27,0	5,5±0,33*	+22,2	3,5±0,21**	-39,6
	4,0±0,62		4,5±0,43		5,8±0,33	

Примітка: в чисельнику - дослід, в знаменнику - контроль

*- $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$ порівняно з контролем

За даними морфометричного дослідження, площа хроматину в ядрі збільшувалась на 16,7%, площа мітохондрій в цитоплазмі на 14,1%, площа гранул на 14,5%, порівняно з контролем. Індекс співвідношення активних гранул до неактивних зростав на 14,8%. Вміст АКТГ в крові підвищувався на 22,2% (табл.1).

Отже, у 45-добових щурів після тривалої дії червоного шламу зміни в кортикотропах, що характерні для стрес-реакції становились ще більш вираженими. Про це свідчив стан ультраструктури кортикотропних клітин та морфометричних показників.

Тривала дія червоного шламу на організм тварин впродовж 180 дів приводила до виражених змін в ультраструктурі кортикотропних аденоцитів гіпофіза та їх морфометричних даних. Цитоплазма більшості кортикотропів виглядала світлою. В ній виявлялось багато елементів вакуолярної ендоплазматичної сітки з чіткими рибосомами на поверхні мембран. У цитоплазмі можна було бачити невелику кількість дрібних гранул секрету різного ступеню зрілості, які розташовувались як по периферії клітин, так і у вигляді невеликих скупчень в центральній частині цитоплазми. Комплекс Гольджі і мітохондрії в цитоплазмі кортикотропів не визначались. Ядро спостерігалось велике, мало дещо звивисті контури. У каріоплазмі відмічалась помірна кількість гетерохроматину, який розміщувався у вигляді скупчень як примембранно, так і по всій цитоплазмі.

У деяких кортикотропах більша частина цитоплазми виглядала в стані повної деструкції. Більшість органел було зруйновано. В інших ділянках цитоплазми можна було бачити численні дрібні, різко осміофільні мітохондрії паличкоподібної або неправильної форми. Їх матрикс був різко ущільнений, іноді виднілись міжкристні простори. Секреторні гранули виявлялись поліморфні, збільшені в розмірах, підвищеної осміофільності, а поодинокі з них мали просвітлений ободок. У цитоплазмі кортикотропів також зустрічались лизосоноподібні структури. Ендоплазматична сітка була дезорганізована, відмічались неправильної форми порожнини, а також короткі зігнуті трубочки. Рибосоми як зв'язані, так і вільні були відсутні. Ядро в цих кортикотропах не виявлялось (рис. 2).

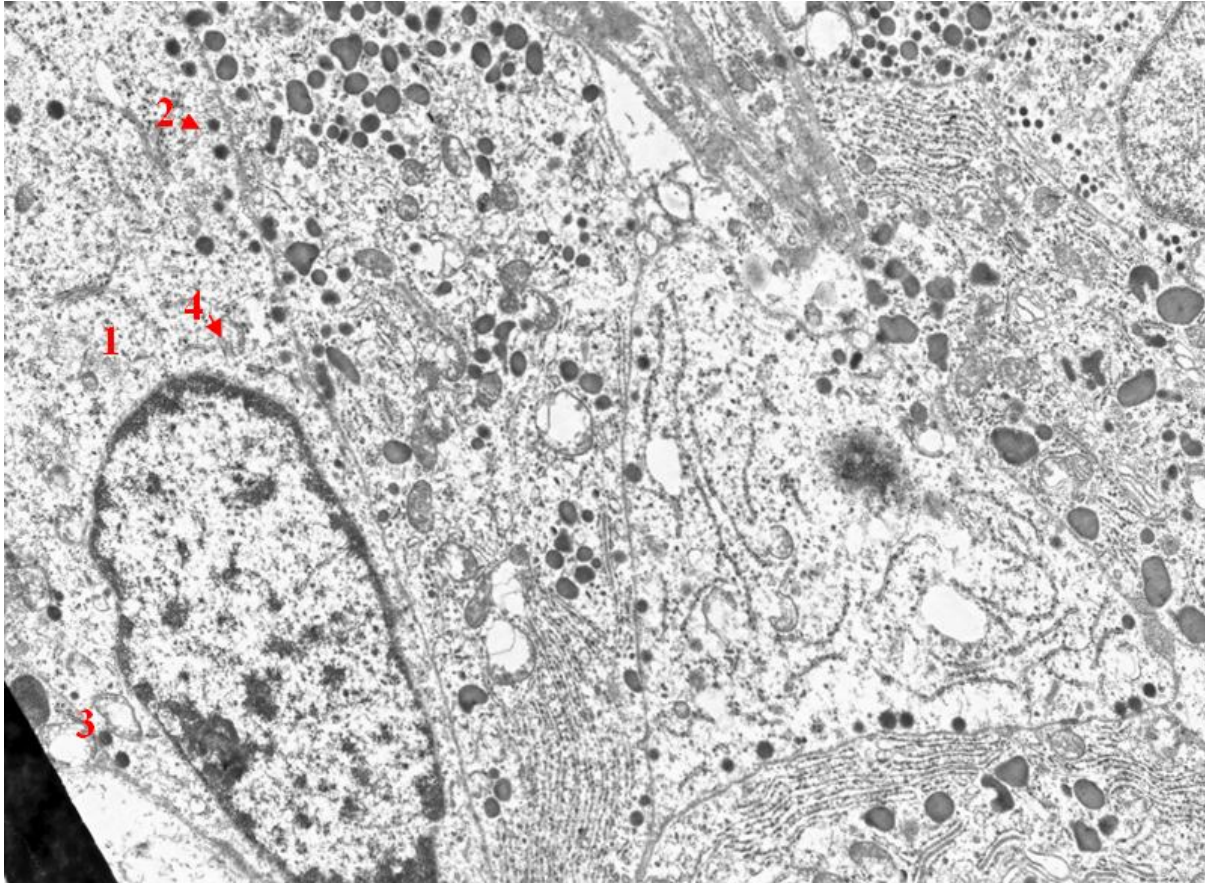


Рис. 2. Електронограма. Аденогіпофіз 180-добового щура після тривалої дії червоного шламу. Кортикотроп(1).В кортикотропі ділянки деструкції органел. Одиначні секреторні гранули різної електронної щільності збільшенні в розмірах (2). У цитоплазмі елементи вакуолярної ендоплазматичної сітки (3). Мітохондрії з просвітленням матриксу і руйнованими кристами (4).x 10000.

Дані перебудови ультраструктури кортикотропів підтверджувались змінами морфометричних показників і вмісту АКТГ в крові. При цьому, площа хроматину в ядрі зменшувалась на 29,4%, порівняно з контрольною групою тварин. В цитоплазмі площа мітохондрій знижувалась на 11,6%, а секреторних гранул на 28,5%. Індекс співвідношення активних гранул до неактивних знижувався на 15,9%. Рівень АКТГ в крові зменшувався на 39,6% (табл. 1).

Отже, в результаті 180-денної дії червоного шламу у кортикотропних клітинах відмічалось зниження функціональної активності з ознаками деструктивно-дистрофічних змін у цитоплазмі

Висновки

Дія червоного шламу на організм тварин протягом 14 діб приводить до посилення функціональної активності кортикотропів аденогіпофіза, про що свідчать ультраструктурні зміни клітин, їх морфометричні дані і підвищення вмісту адренкортикотропного гормону в крові. Однак в ультраструктурі деяких кортикотропів відбувається дегрануляція цитоплазми з ознаками зниження функції ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі і порушень мітохондрій.

Після 45 діб дії червоного шламу в ультраструктурі кортикотропних клітин спостерігаються зміни характерні для стрес-реакції, які стають ще більш вираженими і відповідають стадії підвищеної резистентності загального адаптаційного синдрому.

При дії червоного шламу протягом 180 діб в кортикотропах аденогіпофіза наступають зміни, що характерні для стадії виснаження загального адаптаційного синдрому. Знижується адренкортикотропна функція аденогіпофіза, визначаються деструктивно-дистрофічні зміни у цитоплазмі кортикотропів, що супроводжується зменшенням показників морфометричних даних цих клітин та вмісту АКТГ в крові.

Література

1. Гордиенко В. М., Козырицкий В.Г. Ультраструктура желез эндокринной системы / В. М. Гордиенко, - К. : Здоров'я, 1978. - 288 с.
2. Каваре В.І. Електронна мікроскопія аденогіпофіза під впливом комбінованої дії загального опромінення і солей важких металів / В.І. Каваре // Український медичний альманах. - 2000. - №3. - С. 70-73.
3. Карташев А.Г. Влияние хронических факторов в постнатальном онтогенезе животных /А.Г. Карташев. - Томск: «В-Спектр», 2010. - 122 с.
4. Пикалюк В.С., Шкуренко В.П., Кутя С.А. Органы внутренней секреции. / В.С. Пикалюк. - Симферополь, 2007. – 96 с.
5. Бобришева І.В. Ультраструктурна характеристика аденогіпофіза білих щурів на різних етапах постнатального онтогенезу / І.В. Бобришева // Морфологія. – 2013. - Том VII. - № 3. – С. 27- 32.
6. Капитонова М.Ю. Иммуногистохимическая характеристика гипофиза в норме и при хроническом стрессе / М.Ю.Капитонова, С.Л. Кузнецов, В.В. Хлебников, В.Г. Загребин, З.Ч. Морозова, Ю.В. Дегтярь // Морфология.- 2008.- Т. 134.-№6.- С.32-37.
7. Кухар І.Д. Морфофункціональний стан аденогіпофізу та надниркових залоз після локального впливу на шкіру тварин високої і низької температур : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.03.01 / І.Д.Кухар. – Харків, 2003. – 38 с.
8. Большакова О.В. Ультраструктура кортикотропоцитов при интоксикации свинцом / О.В. Большакова // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 2016. - № 1. – С.37-39.
9. Рогозина О.В., Озерова Н.Ю., Каширина Н.К. Морфология аденогипофиза и надпочечников под воздействием свинцовой интоксикации та ее коррекции / О.В. Рогозина // Світ медицини та біології. – 2009. - № 3. – С. 136 – 140.
10. Лапач С. К. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. / С. К. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К. : МОРИОН, 2001. – С. 144-155.
11. Лях Ю. Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю. Е. Лях.- Донецк, 2006. – 211 с.

References

1. Gordienko V.M., Kozyritskiy V.G. (1978). Ultrastructure of the endocrine system glands. K.: Health Protection, 288 p. (in Rus.)
2. Kavare V.I. (2000). Electron microscopy of adenohipophysitis influenced by the combined action of radiation and heavy metal salts. Ukrainian medical almanac. 3. P. 70-73. (in Ukr.)
3. Kartashev A.G. (2010). Effect of chronic factors in postnatal ontogenesis of animals. Tomsk: "In-Spectrum", 122 p. (in Rus.)
4. Pykaliuk V.S., Shkurenko V.P., Kutia S.A. (2007). Organs of internal secretion. Simferopol, 96 p. (in Ukr.)
5. Bobrysheva I.V. (2013). Ultrastructural characteristics of adenohipophysitis of white rats on different stages of postnatal ontogenesis. Morphology. VII. 3. P. 27-32. (in Ukr.)
6. Kapitonova M.Yu. et al (2008). Immunohistochemical characteristics of the adenohipophysitis in normal condition and chronic stress. Morphology. 134. 6. P.32-37. (in Rus.)

7. Kukhar I.D. (2003). Morphofunctional state of the adenohypophysis and adrenal glands after local exposure to animals' skin of high and low temperatures: Dissertation Abstract ... Doctor of medical sciences: 14.03.01 Kharkiv, 38 p. (in Ukr.)
8. Bolshakova O.V. (2013) Ultrastructure of adenohypophysial corticotropic hormone cells on lead intoxication. Tauride Medical and Biological Bulletin. 16. 1. P.37-39. (in Rus.)
9. Rogozina O.V., Ozerova N.Yu., Kashirina N.K. (2009). Morphology of adenohypophysis and adrenal glands under the influence of lead intoxication and its correction. World of medicine and biology. 3. P. 136-140. (in Rus.)
10. Lapach S.K., Chubenko A.V., Babych P.N. (2001). Statistical methods in biomedical research using Exel. K: MORION, P. 144-155. (in Rus.)
11. Liakh Yu.E. (2006). Basics of computer biostatistics Donetsk, 2006. – 211 p.

Summary. Boretskyi G.G., Rozhkov I.M. Features of ultrastructural changes of adenohypophysial corticotropic cells under the prolonged exposure of the red mud.

Introduction. By means of modern techniques, new data, regarding the character and dynamics of ultrastructural changes in adenohypophysial corticotropic cells under condition of prolonged organism exposure of the red mud, has been obtained.

Purpose. To evaluate the dynamics of the ultrastructural changes and the direction of reparative processes in adenohypophysial corticotropic cells of animals of all ages under organism exposure of the red mud.

Methods. The ultrastructure of adenohypophysial corticotropic cells using electron microscope GEM – 100CX (Japan) has been studied. To establish the ultrastructural patterns of adenohypophysis' corticotroph, morphometric processing of electron-diffraction photograph by means of computer image analyzer IBAS-2000 (produced by ORTON company, Germany) was conducted. The concentration of adrenocorticotropic hormone (ACTH) was established by means of "two-stage" enzyme-linked immunosorbent assay to measure biologically active ACTH molecule using test-kit produced by Biometrica company (USA).

Results. The research has established that the exposure of the red mud on animals' organism during 14 days leads to increased functional activity of adenohypophysial corticotropic cells. This fact is evidenced by ultrastructural changes in these cells, their morphometric data and increase of the adrenocorticotropic hormone content in blood. However, degranulation of cytoplasm characterised by reduction of endoplasmic reticulum function, Golgi complex and mitochondrial abnormalities, occurs in ultrastructure of some corticotrophs' structure.

After 45 days of the red mud exposure, in the ultrastructure of corticotropic cells, changes typical for the stress reactions, are observed. Further the changes become more pronounced and are characteristic of the stage of the increased resistance of general adaptation syndrome.

Under the exposure of red mud during 180 days, the adenohypophysis' corticotrophs face restructuring which are characteristic of exhaustion stage of general adaptation syndrome. Adrenocorticotropic function of adenohypophysis is reduced, destructive-dystrophic changes in cytoplasm of corticotrophs, accompanied by a rate decrease of morphometric data of these cells and ACTH content in blood, are established.

Originality. Using modern biomedical research methods, new data regarding the character and dynamics of ultrastructural changes in adenohypophysial corticotropic cells under the prolonged exposure of the red mud, has been obtained. The dependence of changes of the ultrastructure and the function of adenohypophysial corticotropic cells on the duration of the red mud exposure in animals' organisms of all ages has been established.

Conclusion. The prolonged exposure of the red mud on animals' organisms leads to significant changes in the ultrastructural organization of adenohypophysial corticotropic cells, the character of which depends on both the duration of the red mud exposure as well as on the animals' age.

Key words: adenohypophysis, corticotropic cells, ultrastructure, red mud.

Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського

Одержано редакцією

22.01.2016

Прийнято до публікації

05.02.2016