

## РОЛЬ СТРУКТУРНОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА В ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ<sup>1</sup>

Е. П. ТИМОХИНА<sup>1)</sup>, В. В. ЯГЛОВ<sup>1)</sup>, С. С. ОБЕРНИХИН<sup>1)</sup>,  
Н. В. ЯГЛОВА<sup>1)</sup>, С. В. НАЗИМОВА<sup>1)</sup>, Д. А. ЦОМАРТОВА<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Научно-исследовательский институт морфологии человека,  
ул. Цюрупы, 3, 117418, г. Москва, Россия

Стероидогенная активность кортикостероцитов существенно меняется в постнатальном периоде онтогенеза. Однако возрастные изменения митохондриального аппарата кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторной функции мало изучены. Целью работы был анализ структурных перестроек митохондриального аппарата кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в процессе возрастных изменений и сопоставление их с динамикой морфофункциональных трансформаций коркового вещества. Исследование проведено на самцах крыс вистар пубертатного и постпубертатного возраста. Определены количественные показатели структуры коркового вещества методом световой микроскопии и ультраструктуры кортикостероцитов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, а также продукция соответствующих стероидных гормонов посредством иммуноферментного анализа. Выявлены различные структурные изменения митохондриального аппарата, происходящие в кортикостероцитах при переходе от пубертатного периода к постпубертатному, которые влияют на активность

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Тимохина ЕП, Яглов ВВ, Обернихин СС, Яглова НВ, Назимова СВ, Цомартова ДА. Роль структурной реорганизации митохондриального аппарата в возрастных изменениях функционирования коркового вещества надпочечников. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:13–18.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-13-18>

### For citation:

Timokhina EP, Yaglov VV, Obernihyn SS, Yaglova NV, Nazimova SV, Tsomartova DA. Role of reorganization of mitochondria structure in age-dependent changes of adrenal cortex function. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:13–18. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-13-18>

### Авторы:

**Екатерина Петровна Тимохина** – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

**Валентин Васильевич Яглов** – доктор медицинских наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

**Сергей Станиславович Обернихин** – доктор медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

**Наталья Валентиновна Яглова** – доктор медицинских наук; заведующий лабораторией развития эндокринной системы.

**Светлана Владимировна Назимова** – кандидат медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

**Дибакхан Асланбековна Цомартова** – кандидат медицинских наук; младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

### Authors:

**Ekaterina P. Timokhina**, PhD (biology); researcher at the laboratory of endocrine system development.

[rodich\\_k@mail.ru](mailto:rodich_k@mail.ru)

**Valentin V. Yaglov**, doctor of science (medicine), full professor; chief researcher at the laboratory of endocrine system development.

[vyaglov@mail.ru](mailto:vyaglov@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

**Sergey S. Obernihyn**, doctor of science (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.

[ober@mail.ru](mailto:ober@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

**Natalia V. Yaglova**, doctor of science (medicine); head of the laboratory of endocrine system development.

[yaglova@mail.ru](mailto:yaglova@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

**Svetlana V. Nazimova**, PhD (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.

[pimka60@list.ru](mailto:pimka60@list.ru)

<https://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

**Dibakhan A. Tsomartova**, PhD (medicine); junior researcher at the laboratory of endocrine system development.

стероидогенеза в большей степени, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и структурных перестроек митохондрий указывает на необходимость дополнительных ультраструктурных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма.

**Ключевые слова:** митохондрия; надпочечник; кортикостероцит; стероидогенез; стероидные гормоны; постнатальное развитие.

## ROLE OF REORGANIZATION OF MITOCHONDRIA STRUCTURE IN AGE-DEPENDENT CHANGES OF ADRENAL CORTEX FUNCTION

*E. P. TIMOKHINA<sup>a</sup>, V. V. YAGLOV<sup>a</sup>, S. S. OBERNIKHIN<sup>a</sup>,  
N. V. YAGLOVA<sup>a</sup>, S. V. NAZIMOVA<sup>a</sup>, D. A. TSOMARTOVA<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>Research Institute of Human Morphology, 3 Tsyurupy Street, Moscow 117418, Russia*

*Corresponding author: E. P. Timokhina (rodich\_k@mail.ru)*

Steroidogenic activity of adrenal cortical cells is known to change significantly during postnatal development. Age-dependent changes of mitochondrial apparatus and its impact in secretory activity of the adrenal cortex are less studied. The aim was to uncover age-dependent mitochondrial dynamics in rat glomerulosa, fasciculata and reticularis cells, and to assess them together with changes in adrenal cortex morphology and function. Pubertal and postpubertal male Wistar rats were used in the research. Quantitative parameters of adrenal cortex morphology and fine structure of adrenocortical cells were examined by light and transmission electron microscopy. Production of adrenal hormones was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. Discrete age-dependent changes of mitochondrial dynamics was revealed. These changes were found more sufficient for hormone production than alterations in morphology of adrenocortical zones. Association of changes in mitochondrial structure with intensity of hormone secretion demonstrate that morphological studies of adrenal cortex requires examination of fine structure for correct assessment of adrenal development.

**Keywords:** mitochondrion; adrenal gland; adrenal cortical cell; steroidogenesis; steroid hormones; postnatal development.

### Введение

В литературе имеется достаточное количество работ, раскрывающих структурные основы синтеза стероидных гормонов в клетках коркового вещества надпочечников. Процессы стероидогенеза обеспечиваются ферментами, локализованными в митохондриях и гладкой эндоплазматической сети. Известно, что наибольшие изменения при стимулировании или подавлении стероидогенеза претерпевают именно митохондрии [1; 2]. Следовательно, структура митохондриального аппарата служит одним из основных показателей секреторной активности кортикостероцитов [3–5]. Известно, что в постнатальном периоде онтогенеза стероидогенная функция клеток существенно меняется. Наиболее сложное развитие и становление стероидогенеза наблюдается в корковом веществе надпочечников. У крыс секреторная активность пучковой зоны усиливается в пренатальном периоде и снижается в постнатальном [6–8]. С трехнедельного возраста начинается синтез половых гормонов в сетчатой зоне [9]. Данные процессы обусловлены активацией ферментов гидроксилаз, однако возрастные изменения митохондриального аппарата кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторной функции изучены в значительно меньшей степени.

Цель работы – проанализировать структурные перестройки митохондриального аппарата кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в процессе возрастных изменений и сопоставить их с динамикой морфофункциональных трансформаций коркового вещества.

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 20 самцах крыс вистар. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 6 нед. ( $n = 10$ ), что соответствует пубертатному периоду, и 10 нед. ( $n = 10$ ), т. е. после наступления половой зрелости, когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития [9]. Эксперимент выполнен в соответствии с нормами обращения с лабораторными

животными, закрепленными в Международных рекомендациях (этическом кодексе) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (разработаны и опубликованы Советом международных научных организаций в 1985 г.), Правилах лабораторной практики в Российской Федерации (утверждены приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 г. № 267), Федеральном законе «О защите животных от жестокого обращения» от 1 декабря 1999 г. (проект № 97802163-2), а также Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных (утверждены приказом Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755).

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. Изготавливали препараты экваториальных срезов органа, которые после стандартной гистологической проводки окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», Россия). Гистологические препараты изучали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM2500 (*Leica Microsystems*, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью программы *ImageScope* (*Leica Microsystems*, Германия). Для изучения ультраструктуры надпочечники фиксировали в 2,5 % растворе глutarового альдегида в 0,1 моль/л какодильном буфере (pH 7,3) с последующей заливкой в смесь эпона и аралдита. Контрастирование срезов проводили водным раствором 2,5 % уранилацетата и цитрата свинца. Исследование срезов выполняли методом электронной трансмиссионной микроскопии с применением микроскопа Libra 120 (*Carl Zeiss*, Германия). В сыворотке крови крыс иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов (*Cusabio*, Китай) определяли концентрацию альдостерона, кортикостерона, а также эстрогена как конечного продукта синтеза половых стероидов сетчатой зоны.

Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ( $M \pm m$ ). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Надпочечники крыс пубертатного периода имели типичное строение. На гистологических срезах четко различались корковое и мозговое вещества. Клубочковая зона коркового вещества включала эндокриноциты с круглыми и овальными ядрами и просветленной цитоплазмой, располагалась под капсулой в виде непрерывного слоя равномерной толщины и занимала менее 10 % площади коркового вещества. Сетчатая зона была представлена анастомозирующей сетью эндокриноцитов, между которыми размещались капилляры. Большинство просветов сосудов были свободны, в остальных находилась плазма, в единичных случаях – эритроциты. Клетки наружной части имели кубическую форму и круглые ядра, клетки внутренней части – меньший размер, полигональную форму. Цитоплазма клеток проявляла ярко выраженные оксифильные свойства, в ней присутствовали липидные включения. Пучковая зона была представлена кубическими эндокриноцитами, образующими тяжи. Пучковая и сетчатая зоны имели одинаковый размер и занимали приблизительно 90 % площади коркового вещества.

Электронно-микроскопическое исследование показало, что кортикостероциты клубочковой зоны содержали митохондрии овальной или округлой формы с пластинчатыми кристами и гомогенным матриксом (рис. 1, а). У значительной части митохондрий наблюдался отек матрикса различной степени. Липидные капли умеренной плотности контактировали с митохондриями и встречались не во всех клетках. В пучковой зоне митохондрии были большего размера и более округлой формы с везикулярными кристами (см. рис. 1, б). Также отмечено большее количество митохондрий с отеком матрикса, чем в клубочковой зоне (см. таблицу). В сетчатой зоне митохондрии имели округлую или овальную форму, а также матрикс средней электронной плотности (см. рис. 1, в). Липидные капли характеризовались выраженной осмиофильностью.

После наступления половой зрелости, когда надпочечники достигают своего максимального развития, наблюдалось уменьшение площади клубочковой зоны (рис. 2) и объемов ее клеток, при этом диаметр ядер остался неизменным. Количество митохондрий увеличилось, однако их размер уменьшился. Снизилась доля митохондрий с отеком матрикса (см. таблицу). Липидные включения встречались реже и были представлены скоплением большого числа липидных капель низкой плотности, которые мало контактировали с митохондриями. Отмечено увеличение концентрации альдостерона в сыворотке крови (рис. 3).

Исследование пучковой зоны надпочечников крыс после наступления половой зрелости показало увеличение ее размеров (см. рис. 2). Количество митохондрий в клетках уменьшилось, а их диаметр увеличился. Снизилась доля митохондрий с отеком матрикса (см. таблицу) и концентрация кортикостерона в сыворотке крови (см. рис. 3).

Сетчатая зона надпочечников крыс в постпубертатном периоде развития не изменилась в размере. Отмечалось уменьшение диаметра клеток, при этом количество митохондрий значительно увеличилось (см. таблицу). По сравнению с предыдущим сроком исследования снизилась продукция половых гормонов в сыворотке крови (см. рис. 3).

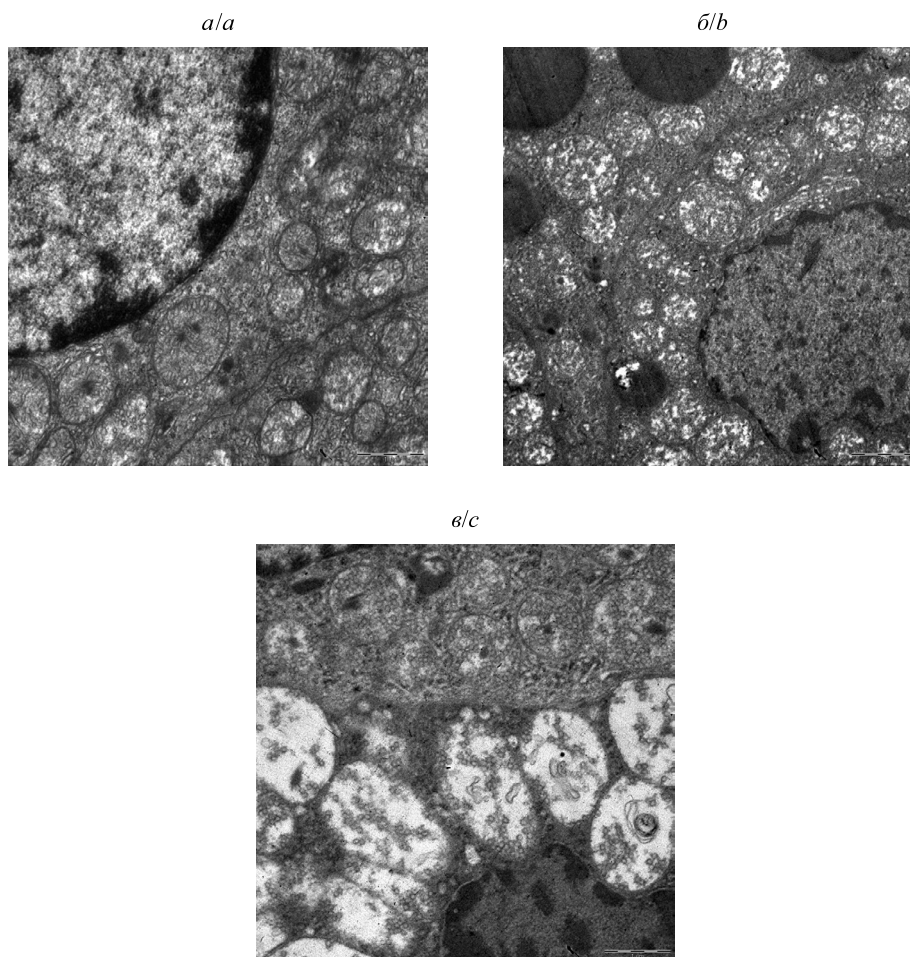


Рис. 1. Структура митохондрий кортикостероцитов клубочковой (а), пучковой (б) и сетчатой (в) зон коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном периоде

Fig. 1. Mitochondria structure in adrenal cortical cells of zona glomerulosa (a), zona fasciculata (b) and zona reticularis (c) in pubertal rats

**Морфологическая характеристика митохондрий кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон надпочечников крысы в пубертатном (6 нед.) и постпубертатном (10 нед.) периодах ( $M \pm m$ )**

**Morphological characteristics of mitochondria of adrenal cortical cells of the glomerular, fascicular and reticular zones of the rat adrenal glands in the pubertal (6 weeks) and postpubertal (10 weeks) periods ( $M \pm m$ )**

Параметры	Клубочковая зона		Пучковая зона		Сетчатая зона	
	6 нед.	10 нед.	6 нед.	10 нед.	6 нед.	10 нед.
Диаметр митохондрий, мкм	$0,99 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02^*$	$1,11 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,05^*$	$1,58 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,04^*$
Количество митохондрий в $1 \text{ мкм}^2$ цитоплазмы	$0,36 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,04^*$	$0,36 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01^*$	$0,29 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02^*$
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	$44,59 \pm 3,34$	$30,22 \pm 1,03^*$	$53,62 \pm 3,34$	$36,87 \pm 1,22^*$	$95,77 \pm 1,22$	$97,25 \pm 3,24^*$

\*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока.



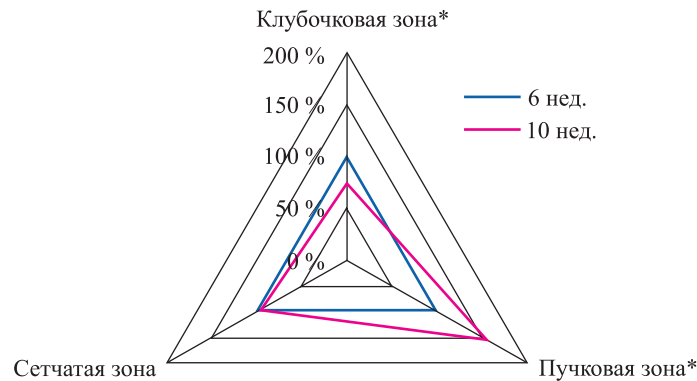


Рис. 2. Возрастные изменения площадей зон коркового вещества надпочечников крысы при переходе от пубертатного периода (6 нед.) к половой зрелости (10 нед.). Значения показателей пубертатного периода приняты за 100 %.  
\*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока  
Fig. 2. Age-dependent changes in the areas of the rat adrenal cortex zones during the transition from pubertal (6 weeks) to postpubertal (10 weeks) periods. The values of the indicators of puberty are taken as 100 %.  
\*Statistically significant differences from previous values

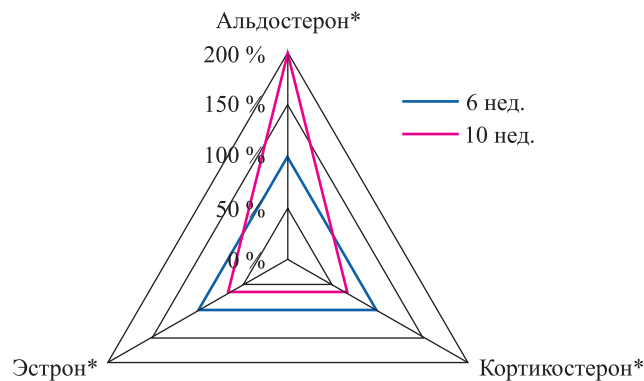


Рис. 3. Концентрации гормонов коркового вещества надпочечников в сыворотке крови крысы при переходе от пубертатного периода (6 нед.) к половой зрелости (10 нед.). Значения показателей пубертатного периода приняты за 100 %.  
\*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока  
Fig. 3. Concentration of adrenal hormones during the transition from pubertal (6 weeks) to postpubertal (10 weeks) periods. The values of the indicators of puberty are taken as 100 %.  
\*Statistically significant differences from previous values

Как известно, митохондрии находятся в состоянии динамического равновесия, которое поддерживается двумя противоположными процессами: регулируемым делением (фрагментацией), приводящим к образованию органелл меньшего размера, и слиянием, опосредующим формирование трубчатых или сетчатых митохондриальных структур [10–13]. Проведенное исследование показало различные изменения в строении коркового вещества, ультраструктуре кортикостероцитов и их секреторной деятельности. В пубертатном периоде активный синтез альдостерона приводил к отеку матрикса митохондрий. После наступления половой зрелости размеры клубочковой зоны уменьшались, а продукция альдостерона увеличивалась. Усиление синтеза гормона обеспечивалось двукратным возрастанием количества митохондрий в клетках в сочетании с уменьшением их размера, что способствовало увеличению площади поверхности внутренних мембран и тем самым повышению стероидогенной активности. Этот факт подтверждает и снижение доли митохондрий с отеком матрикса, который возникает при их функциональной нагрузке. Важно отметить, что стероидогенез обеспечивается последовательными процессами в двух органеллах – митохондриях и гладкой эндоплазматической сети. Как показали исследования, деление митохондрий происходит при участии ретикулярных структур путем образования «петли», перетягивающей митохондрию [14], что свидетельствует о связи активности синтеза стероидов и изменений его структурного обеспечения.

Пучковая зона коркового вещества при переходе к постпубертатному периоду увеличивалась в размерах, при этом продукция кортикостерона не повышалась. Электронно-микроскопическое исследование выявило снижение морфологического субстрата стероидогенной активности: уменьшение количества митохондрий в клетках, в том числе с отеком матрикса, и увеличение их размера. Данное изменение структуры митохондрий, вероятно, происходит за счет их слияния [15]. Известно, что после достижения половой зрелости, когда усиливается синтез стероидов в семенниках, функциональная активность клеток сетчатой зоны уменьшается [9]. Наши исследования показали также снижение продукции половых стероидов. Изменений размеров сетчатой зоны при переходе к постпубертатному периоду развития практически не выявлено, но, в отличие от пучковой зоны, в ней отмечено уменьшение размеров клеток. Возрастные изменения митохондриального аппарата были фактически идентичны изменениям в клубочковой зоне. Тем не менее увеличения продукции женских половых стероидов не наблюдалось. Степень отека матрикса митохондрий также была одинакова в пубертатном и постпубертатном периодах. Предположительно, такая перестройка митохондриального аппарата клеток обусловлена значительным уменьшением объема цитоплазмы. Клетки сетчатой зоны отличаются наименьшими размерами среди кортикостероцитов всех зон коркового вещества надпочечников, а соответственно, и меньшим количеством митохондрий. После достижения половой зрелости уменьшение изначально небольших размеров цитоплазмы требовало перестройки митохондриального аппарата для обеспечения биоэнергетических процессов при ее малом объеме, что подтверждается неизменно высоким уровнем клеток с отеком матрикса митохондрий.

Таким образом, структурная реорганизация митохондриального аппарата влияет на активность стероидогенеза в большей степени, чем изменения размеров зон коркового вещества надпочечников.

### Заключение

При переходе от пубертатного периода к постпубертатному в кортикостероцитах происходят структурные перестройки митохондрий, оказывающие более сильное влияние на активность стероидогенеза, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и реорганизации митохондриального аппарата указывает на необходимость дополнительных ультраструктурных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма.

### Библиографические ссылки / References

1. Chow J, Rahman J, Achermann JC, Dattani MT, Rahman S. Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(2):92–104. DOI: 10.1038/nrendo.2016.151.
2. Tsomartova DA, Yaglova NV, Obernikhin SS, Nazimova SV, Yaglov VV. Secretion of adrenal zona glomerulosa cells in rats exposed to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane during prenatal and postnatal development. *Russian Open Medical Journal*. 2018;7(3):e0302. DOI: 10.15275/rusomj.2018.0302.
3. Domoto DT, Boyd JE, Mulrow PJ, Kashgarian M. The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets. *The American Journal of Pathology*. 1973;72(3):433–446.
4. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145–1159. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
5. Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2):564. DOI: 10.3390/ijms19020564.
6. Could E, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *The Journal of Comparative Neurology*. 1991;313(3):479–485. DOI: 10.1002/cne.903130308.
7. Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology*. 1999;140(7):3342–3353. DOI: 10.1210/endo.140.7.6859.
8. Dupouy JP, Coffigny H, Magre S. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology*. 1975;65(3):347–352. DOI: 10.1677/joe.0.0650347.
9. Pignatelli D, Xiao F, Gouvtia AM, Ferreira JG, Vinson GP. Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
10. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(6):a011072. DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
11. Archer SL. Mitochondrial dynamics – mitochondrial fission and fusion in human diseases. *The New England Journal of Medicine*. 2013;369(23):2236–2251. DOI: 10.1056/NEJMr1215233.
12. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(3):341–360. DOI: 10.1042/ebc20170104.
13. Twig G, Liu X, Liesa M, Wikstrom JD, Molina AJA, Las G, et al. Biophysical properties of mitochondrial fusion events in pancreatic beta-cells and cardiac cells unravel potential control mechanisms of its selectivity. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 2010;299(2):477–487. DOI: 10.1152/ajpcell.00427.2009.
14. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 2011;334(6054):358–362. DOI: 10.1126/science.1207385.
15. Pernas L, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annual Review of Physiology*. 2016;78:505–531. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011.

Статья поступила в редакцию 29.06.2020.  
Received by editorial board 29.06.2020.