

## Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс

*Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, Д.А. Цомартова*

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

*Введение.* Стероидогенная активность клеток надпочечников претерпевает существенные изменения в постнатальном периоде онтогенеза. Однако изменения структуры митохондрий кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторного процесса мало изучены.

Цель настоящей работы – исследовать структурные изменения митохондрий кортикостероцитов в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечника крысы в процессе постнатального развития и сопоставить их с динамикой морфофункциональных показателей коркового вещества.

*Материалы и методы.* 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.

*Результаты.* Выявлены изменения в продукции стероидных гормонов и структуре коркового вещества при переходе от полового созревания к половой зрелости. Установлено, что в процессе полового созревания происходит изменение размеров и числа митохондрий в кортикостероцитах, соответствующих показателям их функциональной активности.

*Заключение.* Установлено, что реорганизация митохондриального аппарата влияет на активность стероидогенеза в большей степени, нежели структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Изменения митохондрий, происходящие в клубочковой и сетчатой зонах, одинаковы, в то время как в пучковой зоне они носят качественно иной характер. Эти данные свидетельствуют о неоднозначности суждения о функциональной активности по изменению размеров зон и клеток коркового вещества надпочечников.

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

**Для корреспонденции:** Наталья Валентиновна Яглова. E-mail: yaglova@mail.ru

**Для цитирования.** Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):64–70. DOI:10.31088/SEM2020.9.1.64-70

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050048-6).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.12.2019. Получена после рецензирования 17.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

## Age-dependent changes of mitochondrial structure regulate steroidogenic activity of rat adrenal cortical cells

*N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, E.P. Timokhina, S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova*

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

*Introduction.* Steroidogenic activity of adrenal cells undergoes significant changes during postnatal development. However, alterations in the mitochondria of corticosterocytes during the development of adrenal cortex and their impact on the secretory process are still poorly studied.

The aim of the study was to evaluate alterations in mitochondrial structure in rat adrenal cortical cells during postnatal development and to compare them with changes in morphology and function of the adrenal cortex.

*Materials and methods.* Male Wistar rats of pubertal and post pubertal age were used in experiment. Quantification of histological and ultrastructural parameters of adrenal cortex and cortical cells as well as production of adrenal steroid hormones was performed.

*Results.* We found age-dependent changes in steroid hormone production and in morphology of adrenal cortex during the transition from puberty to maturity. Adrenal cortical cells showed significant changes in number and size of mitochondria during puberty corresponding to indicators of their functional activity.

*Conclusion.* Reorganization of the mitochondrial apparatus determines the activity of steroidogenesis to a greater extent than the structural changes in the corresponding zones of the adrenal cortex. Zona glomerulosa and zona reticularis demonstrated similar structural changes in mitochondria, whereas zona fasciculata exhibited another type of mitochondria remodeling. These data indicate the ambiguity of judgments about changing the sizes of zones and cells of the adrenal cortex as a marker of their functional activity.

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

**Corresponding author:** Natalia V. Yaglova. E-mail: yaglova@mail.ru

**For citation:** Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Timokhina E.P., Nazimova S.V., Tsomartova D.A. Age-dependent changes of mitochondrial structure regulate steroidogenic activity of rat adrenal cortical cells. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(1):64–70 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.64-70.

**Funding.** The work is done in the framework of the state assignment of Research Institute of Human Morphology (No AAAA-A17-117013050048-6).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 20.12.2019. **Received in revised form** 17.01.2020. **Accepted.** 11.02.2020.

## Введение

Структурные основы секреторного процесса в клетках, синтезирующих стероидные гормоны, были подробно изучены в 1960–1980 годы. Основными оргanelлами, обеспечивающими стероидогенез, являются митохондрии и гладкая эндоплазматическая сеть. Электронномикроскопические исследования стероидпродуцирующих клеток показали, что наибольшие изменения при подавлении или стимулировании синтеза стероидов претерпевают митохондрии, а следовательно, именно структура митохондриального аппарата служит показателем секреторной активности стероидпродуцирующих клеток [1–3]. Тем не менее стероидогенная активность клеток как надпочечных желез, так и семенников и яичников претерпевает существенные изменения в постнатальном периоде онтогенеза. Наиболее сложное развитие и становление стероидогенеза наблюдаются в корковом веществе надпочечников. У крыс секреторная активность пучковой зоны начинается еще в антенатальном периоде, а после рождения значительно снижается [4–6]. С трехнедельного периода активизируется синтез половых гормонов в сетчатой зоне [7]. Общеизвестно, что эти процессы обусловлены активацией ферментов гидроксилаз, однако изменения структуры митохондрий кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторного процесса изучены в значительно меньшей степени.

Цель настоящей работы – исследовать структурные изменения митохондрий кортикостероцитов в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечника крысы в процессе постнатального развития и сопоставить их с динамикой морфофункциональных показателей коркового вещества.

## Материалы и методы

Исследование проведено на 20 самцах крыс Вистар. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 6 недель (n=10), что соответствует пубертатному периоду между адренархе и гонадархе, и 10 недель (n=10), после достижения половой зрелости, когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития [7]. Эксперимент выполнен в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977.

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. Изготавливали препараты экваториальных срезов органа, которые после стандартной гистологической проводки окрашивали гематоксилином и эозином («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% (объем/объем) растворе глутарового альдегида в 0,1M какодилатном буфере (pH 7,3) с последующей заливкой в смесь эпон–аралдит. Контрастирование срезов проводили водным раствором 2,5% (объем/объем) уранилацетата и цитрата свинца.

Исследование срезов проводили методом электронной трансмиссионной микроскопии (Libra 120, Carl Zeiss, Германия).

В сыворотке крови крыс определяли концентрацию альдостерона, кортикостерона, а также эстрогена как конечного продукта синтеза половых стероидов сетчатой зоны иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов (Cusabio, Китай).

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

### Результаты

При гистологическом исследовании надпочечников крыс пубертатного возраста корковое вещество было хорошо развито. В нем отчетливо выделялись клубочковая, пучковая и сетчатая зоны. Пучковая и сетчатая зоны имели одинаковый размер и занимали приблизительно 90% площади коркового вещества (рис. 1).

При электронномикроскопическом исследовании кортикостероциты клубочковой зоны содержали многочисленные митохондрии овальной формы с пластинчатыми кристами. У некоторых митохондрий матрикс имел среднюю электронную плотность, но у многих наблюдались отек матрикса и просветление крист разной степени выраженности (рис. 2 А). В пучковой зоне митохондрии были более округлой формы, большего размера и имели везикулярные кристы (рис. 2 В). Количество митохондрий с отеком матрикса было несколько выше, чем в клубочковой зоне. В сетчатой зоне структура митохондрий более схожа с таковой у митохон-

дрий в пучковой зоне, но отличалась менее электронно плотным матриксом (рис. 2 С).

При переходе от пубертатного периода к половой зрелости, когда надпочечник достигает своего максимального развития, отмечалось уменьшение размеров клубочковой зоны и одновременное повышение продукции альдостерона (рис. 1, 3 А). Кортикостероциты клубочковой зоны уменьшались, но размеры их ядер не изменялись. Наблюдалось увеличение количества митохондрий и уменьшение их диаметра. Снижился и процент митохондрий с отеком матрикса. Сопоставление выраженности изменений размеров клеток, митохондрий и их числа показывало, что увеличение численности митохондрий в единице площади цитоплазмы обусловлено именно увеличением количества митохондрий, а не уплотнением за счет уменьшения объема цитоплазмы (рис. 4 А).

При исследовании пучковой зоны в постпубертатном периоде развития наблюдалось увеличение ее размеров, в то время как продукция кортикостерона не увеличивалась (рис. 1, 3 В). Количество митохондрий в клетках пучковой зоны в отличие от предыдущего срока исследования уменьшилось, а их размер увеличился. Наблюдалось и снижение доли митохондрий с отеком матрикса (рис. 4 В).

Размер сетчатой зоны с возрастом практически не изменялся, но в ней, как и в клубочковой зоне, уменьшился размер клеток, а число митохондрий в единице площади цитоплазмы значительно увеличилось (рис. 1, 4 С). Аналогично клубочковой зоне, увеличение числа митохондрий было более выраженным, нежели уменьшение их размера и объема цитоплазмы. Продукция половых гормонов снизилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 3 С).

### Обсуждение

Известно, что в митохондриальном аппарате клеток происходят изменения, связанные со слиянием и делением митохондрий [8, 9]. Полученные нами данные показывают разнородные изменения в структуре коркового вещества, ультраструктуре его клеток и продукции гормонов. Когда надпочечник достигает своего максимального развития, размеры клубочковой зоны уменьшаются, а продукция альдостерона увеличивается. Наши исследования показали, что ключевым структурным механизмом усиления стероидогенеза является двукратное увеличение количества митохондрий в клетках в сочетании с уменьшением их размера. Способ, с помощью которого митохондрия может реагировать на цитозольные сигналы и изменять свою функциональность, – это процесс деления, при котором происходит образование одной или нескольких дочерних митохондрий [10, 11]. Таким образом, превращение небольшого числа крупных митохондрий в большее количество митохондрий меньшего размера позволяет увеличить площадь поверхности внутренних мембран и как активировать процессы биологического окисле-

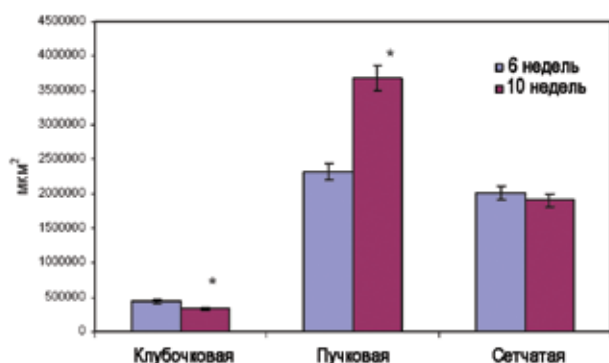


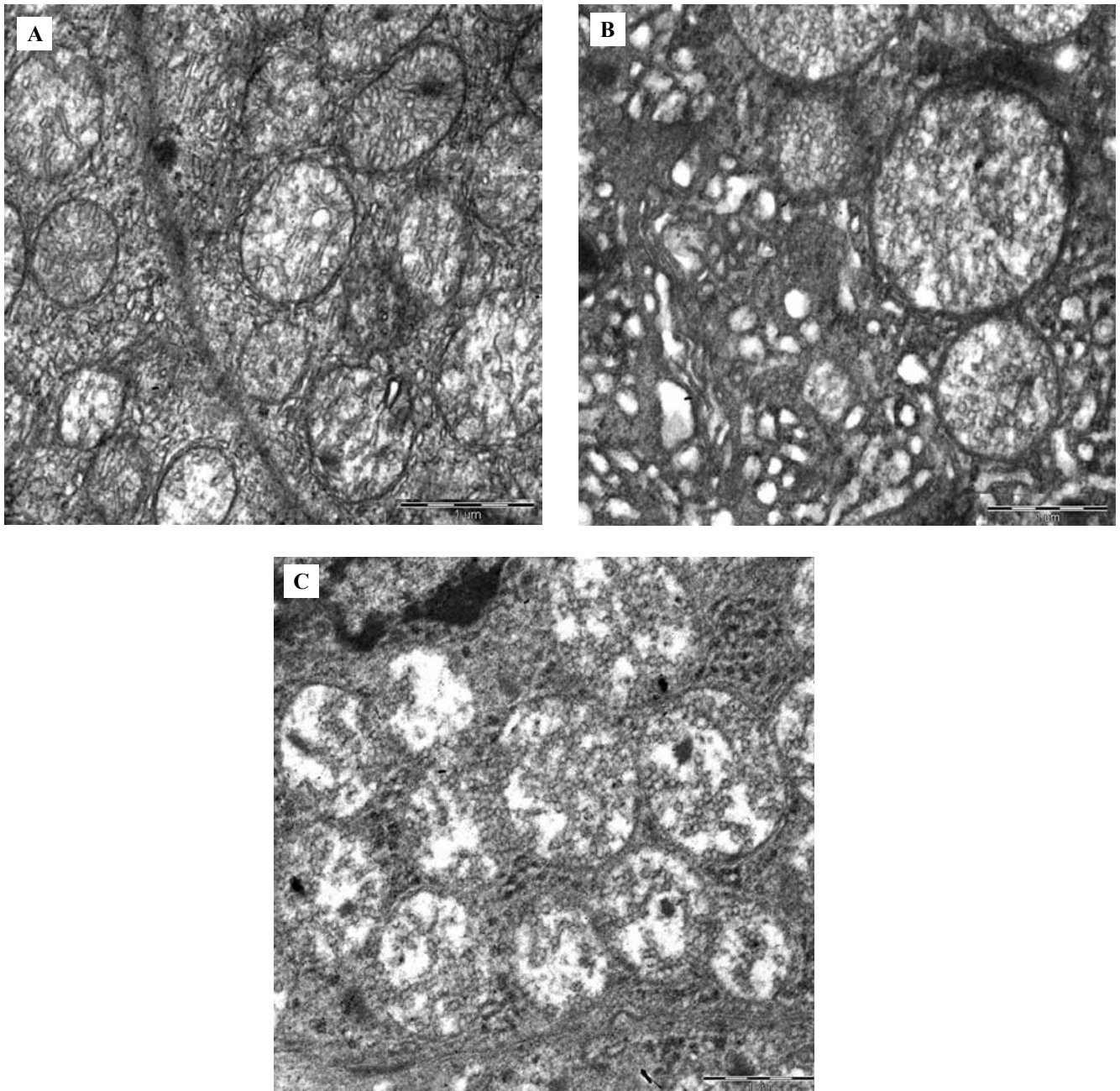
Рис. 1. Площадь зон коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном и постпубертатном периодах ( $M \pm m$ )

\*  $p < 0,001$  по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 1. Adrenal cortex zone area in rats during puberty and postpubertal periods ( $M \pm m$ )

\*  $p < 0,001$  compared to the previous term





*Рис. 2.* Структура митохондрий кортикостероцитов клубочковой (А), пучковой (В) и сетчатой (С) зон коркового вещества надпочечника крысы в пубертатном периоде

*Fig. 2.* Mitochondria structure in adrenocortical cells of zona glomerulosa (A), zona fasciculata (B), and zona reticularis (C) in pubertal rats

ния, так и повысить стероидогенную активность. Это предположение подтверждается и уменьшением процента 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. Исследования показали, что деление митохондрий также происходит при участии ретикулярных структур путем образования «петли», перетягивающей митохондрию [12, 13], что

указывает на связь активности синтеза стероидов и изменений его структурного обеспечения.

В отличие от клубочковой пучковая зона коркового вещества при переходе к половой зрелости организма, наоборот, увеличивается в размерах, а продукция кортикостерона при этом не повышается. Количество митохондрий в клетках уменьшается, а их размер увеличивается. Происходит и снижение доли митохондрий с отеком матрикса, то есть выявляются признаки снижения морфологического субстрата стероидогенной

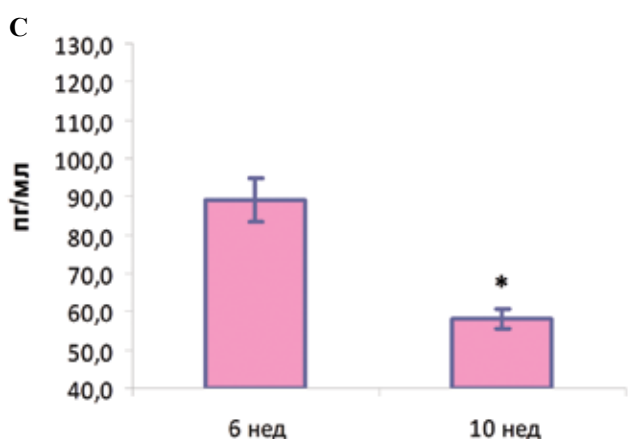
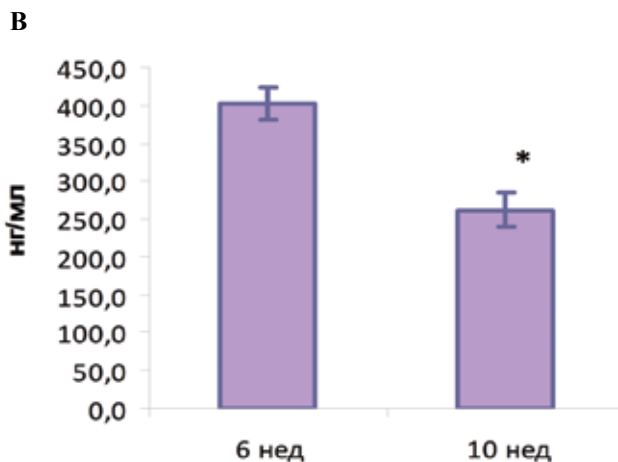
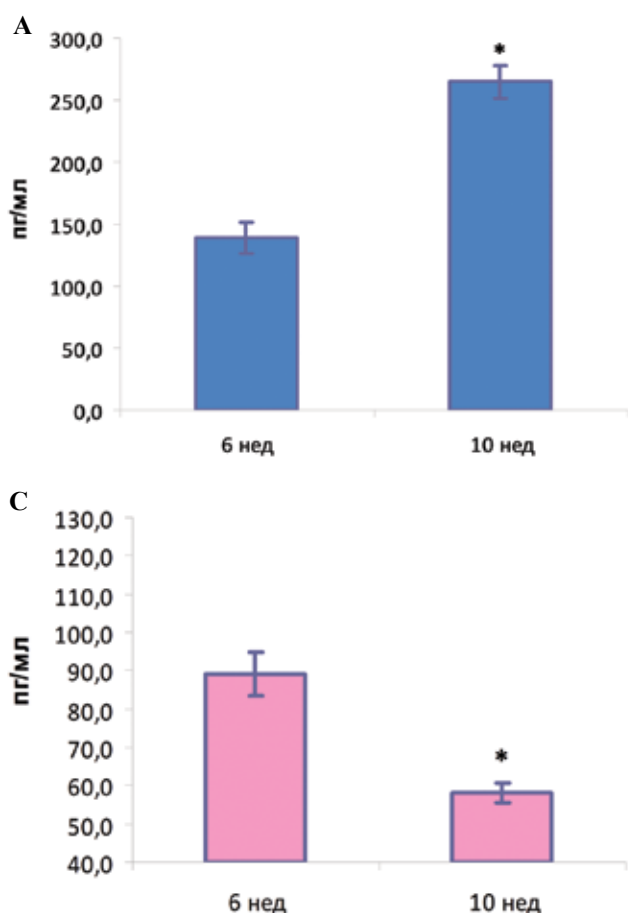


Рис. 3. Возрастная динамика концентрации гормонов коркового вещества надпочечников в сыворотке крови (M±m).  
 А – альдостерон, В – кортикостерон, С – эстрон  
 \* p<0,001 по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 3. Age-dependent changes in serum concentration of adrenal hormones (M±m).  
 A – aldosterone, B – corticosterone, C – estrone  
 \* p<0,001 compared to the previous term



Рис. 4. Морфологическая характеристика митохондрий кортикостероцитов клубочковой (А), пучковой (В) и сетчатой зоны (С).

За единицу приняты значения показателей пубертатного периода  
 \* p<0,001 по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 4. Morphological parameters of mitochondria in adrenocortical cells of zona glomerulosa (A), zona fasciculata (B), and zona reticularis (C).  
 Levels normalized to values of pubertal period  
 \* p<0,001 compared to the previous term

активности. Такое изменение структуры, диктуемое увеличением числа клеток-продуцентов гормона, может происходить за счет слияния митохондрий [14].

После достижения половой зрелости, когда начинается активный синтез стероидов в семенниках, функциональная активность клеток сетчатой зоны снижается [7]. Наши данные также выявили снижение продукции половых стероидов (рис. 2). Размеры сетчатой зоны при переходе к половой зрелости практически не изменялись, но в отличие от пучковой зоны в ней происходит уменьшение размеров клеток. Возрастные изменения митохондриального аппарата клеток были фактически идентичными изменениям в клубочковой зоне. Тем не менее увеличения продукции женских половых стероидов не наблюдалось. Отек матрикса митохондрий был выражен одинаково и в пубертатном, и в постпубертатном периодах. Вероятно, такая перестройка митохондрий обусловлена значительным уменьшением объема цитоплазмы. В корковом веществе надпочечника клетки сетчатой зоны отличаются наименьшими размерами среди кортикостероцитов, а соответственно, и меньшим количеством митохондрий, обуславливающим их повышенную функциональную активность. После достижения половой зрелости уменьшение изначально небольших размеров цитоплазмы требовало перестройки митохондрий для обеспечения биоэнергетических процессов при ее критически малом объеме, что подтверждается неизменно высоким уровнем клеток с отеком матрикса митохондрий.

Выявленные изменения ультраструктуры клеток показывают, что морфологическая оценка изменения функциональной активности структурно-функциональных зон коркового вещества надпочечников по изменению размеров зоны не является достоверной. Учитывая ключевую роль перестройки митохондрий в кортикостероцитах в изменении продукции гормонов, особенно в клубочковой и пучковой зонах, необходимо дополнять морфологическое исследование гистологических препаратов электронномикроскопическими или биохимическими исследованиями.

### Заключение

При переходе от пубертатного периода к половой зрелости в кортикостероцитах происходит реорганизация митохондриального аппарата, влияющая на активность стероидогенеза в большей степени, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Изменения, происходящие в клубочковой и сетчатой зонах, одинаковы, в то время как в пучковой зоне они носят качественно иной характер. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и структурных перестроек митохондрий указывает на необходимость дополнительных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма в эксперименте.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов.  
Сбор и обработка материала – С.В. Назимова, Д.А. Цомартова, Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова.  
Написание текста – Н.В. Яглова, С.С. Обернихин.  
Редактирование – В.В. Яглов.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov.  
Collected the data and performed the analysis – S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova, E.P. Timokhina, N.V. Yaglova.  
Wrote the paper – N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin.  
Edited the manuscript – V.V. Yaglov.

### Литература/References

1. *Domoto DT, Boyd JE, Mulrow PJ, Kashgarian M.* The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets. *Am J Pathol.* 1973;72(3):433–46.
2. *Nunnari J, Suomalainen A.* Mitochondria: in sickness and in health. *Cell.* 2012;148(6):1145–59. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
3. *Zemirli N, Morel E, Molino D.* Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):pii:E564. DOI: 10.3390/ijms19020564.
4. *Could E, Woolley CS, McEwen BS.* Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol.* 1991;313(3):479–85. DOI: 10.1002/cne.903130308.
5. *Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y.* Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology.* 1999;140(7):3342–53. DOI: 10.1210/endo.140.7.6859.
6. *Dupouy JP, Coffigny H, Magre S.* Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol.* 1975;65(3):347–52. DOI: 10.1677/joe.0.0650347.
7. *Pignatelli D, Xiao F, Gouvtia AM, Ferreira JG, Vinson GP.* Adrenarche in the rat. *J Endocrinol.* 2006;191(1):301–8. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
8. *Archer SL.* Mitochondrial dynamics – mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med.* 2013;369(23):2236–51. DOI: 10.1056/NEJMra1215233.
9. *Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J.* Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341–60. DOI: 10.1042/ebc20170104.
10. *Van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S.* Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6).pii: a011072 DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
11. *Chan DC.* Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265–87. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132529.
12. *Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunna-ri J, Voeltz GK.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011;334(6054):358–62. DOI: 10.1126/science.1207385.

13. *Chakrabarti R, Ji WK, Stan RV, de Juan Sanz J, Ryan TA, Higgs HN.* INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J Cell Biol.* 2018;217(1):251–68. DOI: 10.1083/jcb.201709111.
14. *Pernas L, Scorrano L.* Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:505–31. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011.

### Информация об авторах

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Екатерина Петровна Тимохина – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Дибакхан Асланбековна Цомартова – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека

### Author information

Nataliya V. Yaglova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

Sergey S. Obernikhin – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Valentin V. Yaglov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

Svetlana N. Nazimova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

Ekaterina P. Timokhina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0003-0504-1488>

Dibakhan A. Tsomartova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0002-1381-0200>