

**РЕЛЕВАНТНЫЕ МОДЕЛИ ДИСМОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ,
ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЭНДОКРИННЫМИ ДИСРАПТОРАМИ, В БИМЕДИЦИНСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов, С.В. Назимова

НИИ морфологии человека ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского», Москва, Россия

Биотехнология и биомедицина – взаимосвязанные отрасли наук, чья методологическая база основана на экспериментальных исследованиях и испытаниях. Существуют различные уровни структурной организации живой материи и соответственно, ее исследований. К ним относятся субклеточный, клеточный, тканевой, организменный уровни. Основой и наиболее информативным методом исследований являются эксперименты на уровне организма, моделирующие различные физиологические и патологические процессы. Они проводятся на лабораторных животных, выбор которых, как правило, обусловлен характером исследуемого явления. На сегодняшний день существует большое количество моделей патологических процессов, на которых производится изучение их развития, а также испытания новых методов лечения. Их можно подразделить на модели инфекционно-воспалительных заболеваний, дистрофических и дегенеративных процессов, метаболических и эндокринных нарушений, онкологических заболеваний, профессиональных заболеваний и воздействия неблагоприятных антропогенных факторов. Они включают в себя как полное, так и частичное воспроизведение исследуемого процесса. На сегодняшний день успешно моделируются заболевания сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, нервной системы. Имеются данные о попытках создания моделей психических расстройств, таких как шизофрения, депрессивные расстройства и т. д.

В последние полвека активное развитие химии привело к возникновению большого количества классов новых соединений, с которыми организм человека и животных не сталкивался в процессе эволюционного развития. Многие из них оказались веществами, обладающими свойствами даже в крайне низких дозах вызывать физиологические эффекты, влиять на работу регулирующих интегративных систем. Эти вещества получили название эндокринных дисрапторов, поскольку многие их эффекты были опосредованы нарушением продукции, рецепции и сигналинга гормонов [5, 11]. На сегодняшний день установлено наличие дисрапторных свойств более чем у тысячи химических соединений, многие из которых являются компонентами пищевых продуктов и их упаковки, входят в состав косметических и санитарно-гигиенических средств, строительных материалов и материалов для ремонта и т. д. Скрининговые исследования показывают, что многие из них обнаруживаются в организме человека и животных повсеместно с частотой 80–100 %. Большинство эндокринных дисрапторов обладают способностью проникать через плацентарный барьер, и опасность этих соединений обусловлена способностью нарушать регуляцию морфогенетических процессов, то есть процессов закладки, развития, роста и физиологической регенерации органов [4].

Одним из универсальных эндокринных дисрапторов является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Это обусловлено как длительностью его распада, так и продолжающимся интенсивным использованием [8, 10]. ДДТ и его метаболиты обнаруживаются в крови и моче свыше, чем у 90 % населения [6]. Наши многолетние исследования показали, что воздействие низких, так называемых фоновых доз ДДТ приводит к нарушению развития ряда эндокринных желез и органов иммунной защиты [2,3]. Эти данные подтверждаются результатами массовых обследований населения, выявляющих различные отклонения в развитии и функционировании эндокринной, репродуктивной и иммунной систем. Следовательно, наряду с созданием моделей патологических процессов, а также для тестирования новых препаратов, в том числе вакцин, необходимо разработать новые дисморфогенетические модели, отражающие те изменения в программе развития и функционирования органов, которые наблюдаются у населения и часто носят характер латентной патологии.

В связи с вышесказанным, нами была поставлена цель разработать релевантную модель дисморфогенетических нарушений развития коркового вещества надпочечников эндокринным дисраптором ДДТ.

Материалы и методы

У человека воздействие ДДТ начинается во внутриутробном периоде, поскольку он легко проникает через гистогематические барьеры. После рождения потребление ДДТ увеличивается, поскольку основным его источником для организма человека является материнское молоко. ДДТ активно экскретируется с молоком, что и обуславливает рост нагрузки. В дальнейшем ребенок потребляет ДДТ самостоятельно в составе продуктов питания. Для создания модели был оценен уровень воздействия ДДТ на население в первую очередь развитых стран, где оно минимально, сопоставлены данные о фармакокинетике данного вещества у лабораторных животных [12], и были выбраны вид животных (крыса) и дозы ежедневного воздействия 2–3 мкг/кг массы тела.

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Моделировали воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм аналогичное воздействию на человека, то есть пренатальное и постнатальное воздействие на организм. Для этого самки крыс с момента ссаживания с самцами потребляли вместо воды водный раствор с концентрацией о, п-ДДТ 20 мкг/л («Sigma», США). В течение подсосного периода потомство крыс, составившее первую опытную группу, получало низкие дозы ДДТ с молоком матери. По достижению потомством трехнедельного возраста они были переведены на самостоятельное вскармливание с заменой питьевой воды на аналогичный раствор ДДТ. Среднесуточное потребление ДДТ крысами составило $2,89 \pm 0,15$ мкг/кг. Расчет потребляемой дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к определению низких доз для ДДТ [9] и нормативов содержания ДДТ в продуктах питания в России [1]. Животные контрольной группы ($n=12$) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Животных выводили из эксперимента в два этапа. Первый – это пубертатный период, когда надпочечники активно растут, второй – возраст, когда надпочечники достигают максимального развития и их рост заканчивается [7].

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. После стандартной гистологической проводки изготавливали экваториальные срезы органа, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования надпочечники фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида с постфиксацией в 1 % растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы исследовали с помощью трансмиссионного микроскопа «Libra 120» («Carl Zeiss», Германия). Морфометрические исследования проводили с использованием программы «ImageScope» («Leica Microsystems», Австрия). Концентрацию надпочечниковых гормонов в крови крыс определяли методом ИФА с помощью коммерческих наборов («Cusabio», Китай, «IBL», Германия).

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). 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 учётом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития, в пубертатном периоде масса надпочечников меньше, чем в возрастном контроле. Соотношение коркового и мозгового вещества не отличается от контрольных значений.

В структуре коркового вещества присутствуют следующие изменения (рис. 1а). Клубочковая зона развита фрагментарно. Ее площадь меньше значений контрольной группы. Наблюдается расширение сосудов микроциркуляторного русла, стазы эритроцитов, вследствие чего происходят кровоизлияния, дистрофические изменения и гибель кортикостероцитов. Одновременно наблюдаются и участки регенерации. В целом, пучковая зона по степени развития соответствует контролю. Размеры сетчатой зоны и ее клеточная плотность значительно понижены. Кортикостероциты сетчатой зоны отличались более крупными размерами, в том числе и размерами ядер и более оксифильной цитоплазмой. Просветы сосудов как правило были свободны.

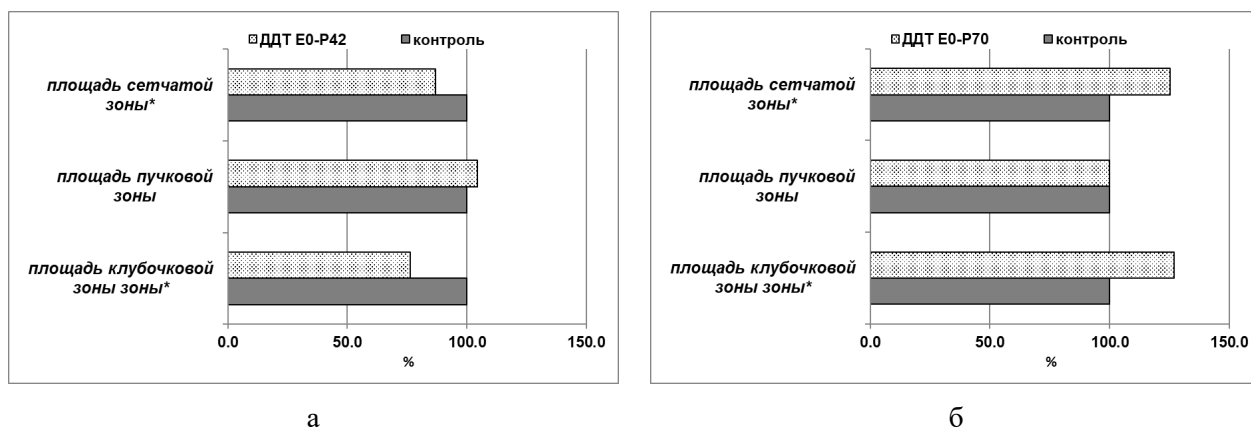


Рис. 1. Отличия постнатального развития коркового вещества надпочечников у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, на 42-е (а) и 70-е (б) сутки. Обозначения: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,01$).

После достижения половой зрелости на 70-е сутки постнатального развития корковое вещество надпочечников в норме завершает свой рост. При этом происходит увеличение только пучковой зоны, сетчатая зона не увеличивается, а клубочковая уменьшается. Пролиферативная активность клеток снижается. Одновременно происходят и ультраструктурные перестройки клеток, направленные на изменение секреторных процессов. В клетках клубочковой зоны увеличивается число митохондрий, что позволяет активно поддерживать синтез стероидных гормонов. В пучковой зоне таких изменений не наблюдается. В сетчатой зоне также происходит реорганизация митохондриального аппарата.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периоде развития, к 70-м суткам масса надпочечников также увеличивается, но не достигает контрольных значений. Происходит увеличение соотношения коркового и мозгового вещества за счет большего роста коркового. В отличие от контроля рост клубочковой зоны продолжается, что подтверждает повышенная пролиферация ее клеток и большие размеры (рис. 1б). Микроциркуляторные расстройства регрессируют. У крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, перестройка митохондрий происходит более медленными темпами, чем в контроле, поэтому, несмотря на активное развитие клубочковой зоны, уровень альдостерона не превышает контрольных значений. Пучковая зона развивается адекватно показателям возрастного контроля (рис. 1б). У половины животных в пучковой зоне выявляются дистрофические изменения и гибель кортикостероцитов в сочетании со стазом эритроцитов в капиллярах. Появляются очаги лимфоцитарной инфильтрации. В клетках пучковой зоны происходит увеличение числа митохондрий. Размеры сетчатой зоны увеличиваются по сравнению с предыдущим сроком и превышают значения контрольной группы (рис. 1б), однако клеточная плотность остается низкой. В качестве компенсаторной меры в клетках происходит более ранняя реорганизация митохондриального аппарата.

Выводы

Таким образом, воздействие эндокринного дисраптора ДДТ в низких дозах, соответствующих уровню воздействия на человека, нарушает постнатальный морфогенез коркового вещества надпочечников. Наибольшую чувствительность проявляют клубочковая и сетчатая зоны, что приводит к замедлению темпов их развития, нарушению баланса процессов роста и становления секреторной деятельности. При этом нарушается продукция минералокортикоидов, глюкокортикоидов и половых стероидов, но изменения физиологических параметров крыс не проявляют себя. Таким образом, замена питьевой воды на раствор о, п-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л самкам с момента ссаживания в течение всей беременности и лактации, а затем самостоятельное потребление раствора ДДТ полностью воспроизводит особенности и уровни воздействия ДДТ на развивающийся организм человека, индуцирует дисморфогенетические нарушения в надпочечниках потомства крыс и является легкой выполнимой и воспроизводимой, гуманной по методам воздействия на животных релевантной моделью.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022–0035.

Литература

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб: ГИОРД. 2015. 176 с.
2. Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Влияние низких доз дихлордифенилтрихлорэтана на морфофункциональное состояние тимуса крыс // Бюлл. exper. биол. 2013. Т.155. № 5. С. 657–660.
3. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // Бюлл. exper. биол. 2013. Т.156. № 12. С. 720–722.
4. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дизрапторы – новое направление исследований в эндокринологии // Вестник РАМН. 2012. № 3. С. 56–61.
5. Gore A., Chapell V., Fenton S., Flaws J., Nadal A., Prins J., Toppari J., Zoeller J. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine Disrupting Chemicals // Endocrine Reviews. 2015. V. 36. N. 6. P. E1-E150.
6. Haug L.S., Sakhi A.K., Cequier E., Casas M., Maitre L., Basagana X., Andrusaityte S., Chalkiadaki G., Chatzi L., Coen M., de Bont J., Dedele A., Ferrand J., Grazuleviciene R., Gonzalez J.R., Gutzkow K.B., Keun H., McEachan R., Meltzer H.M., Petravičienė I., Robinson O., Saulnier P.J., Slama R., Sunyer J., Urquiza J., Vafeiadi M., Wright J., Vrijheid M., Thomsen C. In-utero and childhood chemical exposome in six European mother-child cohorts // Environ. Int. 2018. V. 121 (Pt 1). P. 751–763.
7. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarche in the rat // Journal of Endocrinology. 2006. Vol. 191. No. 1. P. 301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972
8. Sanger D.M., Holland A.F., Scot, G.I. Tidal creek and salt marsh sediments in South Carolina coastal estuaries: II. Distribution of organic contaminants // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1999. V. 37. P. 458–471.
9. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D., Lee D. – H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller R., Myers J. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses // Endocrine Reviews. 2012. Vol. 33. P. 378–455.
10. World Health Organization (WHO). The use of DDT in malaria vector control. Global Malaria Program. 2007.
11. World Health Organization. 2012. State of the Science of Endocrine-Disrupting Chemicals. Geneva: International Programme on Chemical Safety.
12. Yamazaki H., Takano R., Shimizu M., Murayama N., Kitajima M., Shono M. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling // Journal of health science. 2010. Vol. 56. No. 5. P. 566–575.