

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

## Особливості ультраструктури ліпідних крапель у клітинах пучково-сітчастої зони кори надниркових залоз щура *in vitro*

*Для изучения ультраструктуры клеток пучково-сетчатой зоны коры надпочечников крысы, находившиеся в условиях первичной культуры, использовали методы электронной микроскопии и морфометрического анализа. В контрольных условиях было выделено три типа клеток, которые отличались особенностями ультраструктуры внутриклеточных органелл. Представлены данные о том, что липидные капли с матриксом, имеющим низкую и равномерную электронную плотность, чаще встречаются в клетках, имеющих морфологические признаки высокой интенсивности стероидогенеза. Липидные капли с электронно-плотным матриксом и окантовкой, имеющей ещё большую электронную плотность, чаще можно было увидеть в клетках, с морфологическими признаками низкой интенсивности стероидогенеза. Апликация кальциевого ионофора A23187 или адренокортикотропного гормона приводила к уменьшению диаметра липидных капель и к одновременному увеличению плотности их расположения в цитоплазме. При этом липидные капли становились более прозрачными для электронов и теряли окантовку. Таким образом, было показано, что электронная плотность матрикса липидных капель чувствительна к изменению концентрации ионов кальция в цитоплазме. Процессы, связанные с прохождением стероидогенеза. Тем не менее, этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях. В статье обсуждается способность липидных капель контактировать с мембранами гладкого эндоплазматического ретикулума, митохондриями, ядерной и цитоплазматической мембранами.*

### ВСТУП

Основною функцією клітин кори надниркових залоз є синтез стероїдних гормонів, який є дуже складним. Зокрема, в ньому беруть участь системи ензимів, розташовані у мітохондріях та у гладенькому ендоплазматичному ретикулумі. Відомо, що попередником усіх типів стероїдних гормонів є холестерол, 70 % котрого депонується в ліпідних краплях. Раніше ліпідні краплі розглядалися лише як скупчення холестеролу, який може бути використаним для стероїдогенезу [1]. Але дослідження останніх років показали, що ліпідні краплі мають досить складну будову. Так, вони покриті мембра-

ною утвореною моношаром фосfolіпідів. Було також встановлено, що в цьому моношарі існує значна кількість протеїнів, а саме: кавеолін, віментин, адипофілін, glucose regulatory protein, олеоїни, переліпіні тощо [14, 17]. При цьому функція згаданих білків, зокрема їх участь у накопиченні, депонуванні та мобілізації холестеролу залишається майже недослідженою. Таким чином, подальше вивчення біохімічних процесів, що відбуваються в ліпідних краплях, може суттєво збагатити наше уявлення про механізм мобілізації холестеролу для участі у стероїдогенезі. Також велике значення може мати вивчення ультраструктури ліпідних крапель та механізмів її регуляції.

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

Мета цієї роботи – вивчення ультраструктури ліпідних крапель у контрольних умовах, після аплікації активатора стероїдогенезу адренкортикотропного гормону (АКТГ) і після збільшення концентрації іонів кальцію у цитоплазмі.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на первинній культурі клітин кори надниркових залоз щура. Методики приготування культури, фіксація препаратів, приготування ультратонких зрізів і контрастування описані раніше [2, 9]. Електронно-мікроскопічний аналіз ультраструктури клітин кори надниркових залоз проводили за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа (JEM 100CX, Японія) при збільшенні від  $\times 2000$  до  $\times 40000$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведенні електронно-мікроскопічні дослідження наявних у культурі клітин кори надниркових залоз щура дозволили виділити чотири типи клітин. Клітини 1-го типу мали добре розвинену сітку мембран гладенького ендоплазматичного ретикулума (гЕПР). Мітохондрії в цих клітинах мали щільний матрикс та велику кількість везикулярних крист, щільні тільця зустрічались досить часто і могли інтенсивно взаємодіяти з ліпідними краплями. Клітини, що були віднесені нами до 2-го типу, відрізнялися порівняно меншою кількістю мембран гЕПР. Мітохондрії у цих клітинах порівняно з цитоплазмою мали більш світлий матрикс, при цьому трубчасті кристи зустрічались частіше, ніж везикулярні. Щільні тільця спостерігалися рідше, ніж у клітинах 1-го типу. Сітка мембран гЕПР у клітинах 3-го типу виявлялася дуже рідко. У мітохондріях спостерігався більш світлий матрикс, у якому можна було побачити головним чином трубчасті кристи, а щільні тільця в клітинах 3-го типу зуст-

річались дуже рідко. Разом із тим особливості ультраструктури цих трьох типів клітин дозволяють зробити висновок про те, що всі вони походять із пучково-сітчастої зони [1]. Детально особливості ультраструктури досліджуваних клітин, а також морфометричні розрахунки ми наводили раніше [3]. Слід зазначити, що в отриманій нами культурі виявлялись адренкортикцити 4-го типу. Вони містили мітохондрії із пластинчастими кристами, отже, ці клітини походять із клубочкової зони кори надниркових залоз, але через те, що на її частку припадає близько 10 % від об'єму кори надниркових залоз [1], ці клітини зустрічались у недостатній кількості, тому їх ультраструктуру не аналізували.

Ультраструктура клітин 1-го типу свідчить про активний синтез ними стероїдних гормонів, клітини 3-го типу мали морфологічні ознаки, характерні для клітин, що синтезують стероїдні гормони у незначній кількості, тоді як клітини 2-го типу займали проміжне положення [1, 4, 5, 8].

При аналізі електроннограм нами було зафіксовано наявність ліпідних крапель, що відрізнялися за електронною щільністю матриксу та наявністю або відсутністю електронно-щільної окантовки (рис. 1). Деякі автори вже припускали існування декількох морфологічних типів ліпідних крапель у цитоплазмі клітин кори надниркових залоз [13, 17].

Також було встановлено, що ультраструктура матриксу ліпідних крапель корелює з наявністю у клітині морфологічних ознак прискороеного стероїдогенезу. Так, матрикс ліпідних крапель у клітинах 1-го типу виявився більш світлим порівняно з матриксом ліпідних крапель тих клітин, що були нами віднесені до 3-го типу. Разом із тим електронно-щільна окантовка на периферії ліпідних крапель, розташованих у цитоплазмі клітин 3-го типу, виявлялась набагато частіше, ніж у матриксі ліпідних крапель, розташованих у цитоплазмі клітин

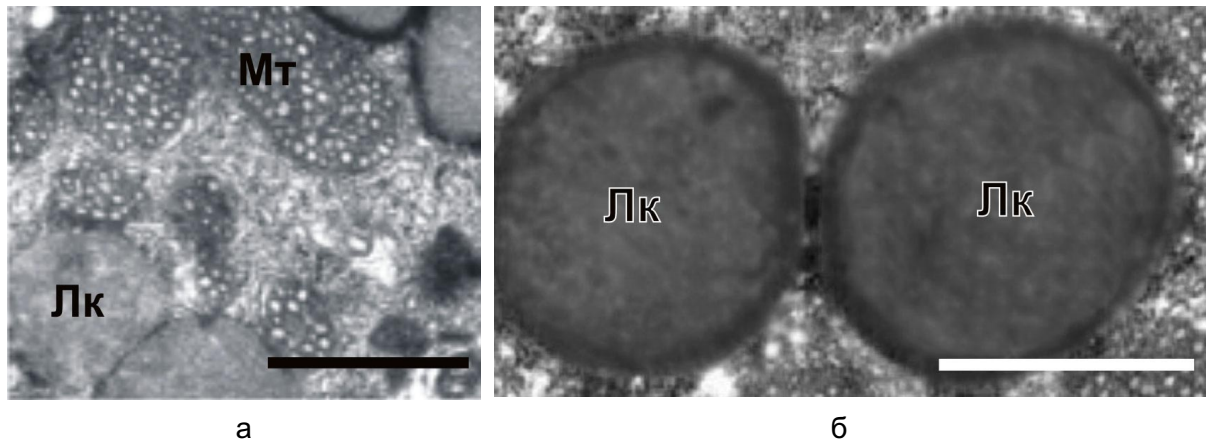


Рис. 1. Перший (а) та другий (б) типи осміюфільності матриксу ліпідних крапель у контролі. Лк – ліпідні краплі, Мт – мітохондрії. Тут і на рис. 2–4. Масштаб 0,5 мкм

1-го типу. Обидва типи осміюфільності матриксу ліпідних крапель ми могли спостерігати в одній клітині або у клітинах, розташованих поруч на одному зрізі. Після аплікації АКТГ або кальцієвого іонофору ліпідні краплі втрачали електронно-щільну окантовку, а їх матрикс ставав світлим (рис. 2).

Таким чином, можна припустити, що осміюфільність матриксу ліпідних крапель може бути пов'язаною із функціональним станом клітини і знаходиться під контролем внутрішньоклітинних механізмів, чутливих до концентрації іонів кальцію. Також можна припустити, що наявність або відсутність

електронно-щільної окантовки в ліпідних краплях пов'язані із наявністю білків на її мембрані, зокрема гормончутливої ліпази. Але лише проведення подальших досліджень допоможе виявити механізми, що впливають на електронну щільність матриксу ліпідних крапель, та з'ясувати їх зв'язок із перебігом стероїдогенезу.

Отримані результати вказують на те, що зміни концентрації іонів кальцію у цитоплазмі клітини можуть також суттєво впливати на морфометричні показники

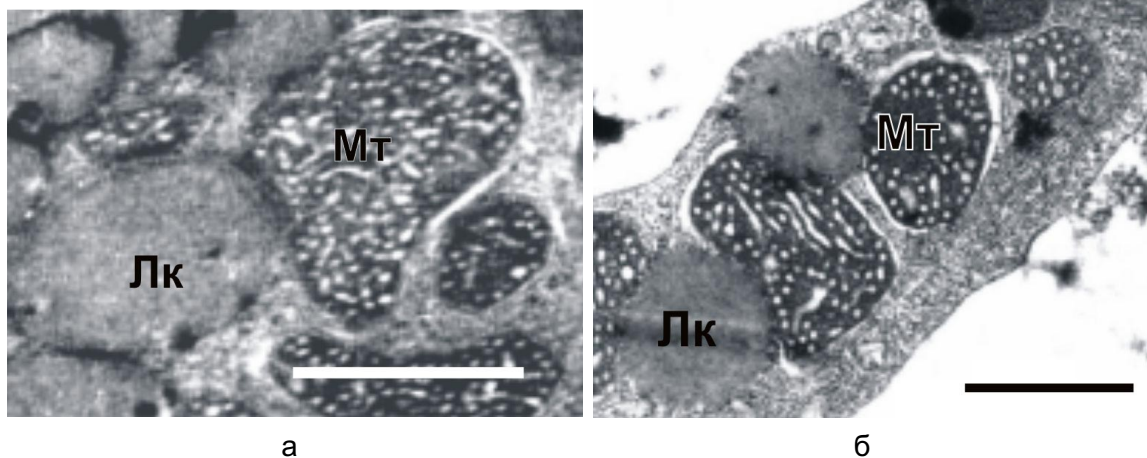


Рис. 2. Осміюфільність матриксу ліпідних крапель після аплікації АКТГ (а), після інкубації з іонофором А23187 (б). Лк – ліпідні краплі, Мт – мітохондрії, Щт – щільне тільце

ліпідних крапель. Так, в літературі описано, що аплікація АКТГ та іонофору викликала вірогідне зменшення діаметра ліпідних крапель і значне вірогідне підвищення щільності їх розташування у цитоплазмі, що можна пояснити активізацією дроблення крапель [3]. Підтвердженням наявності процесу дроблення ліпідних крапель можна вважати існування подвоєних крапель, щільно з'єднаних між собою або зв'язаних неширокими місточками, що, на нашу думку, може відповідати різним стадіям дроблення (рис. 3).

Дроблення ліпідних крапель може бути важливим для збільшення загальної площі поверхні контакту між компартментом ліпідних крапель та навколишньою цитоплазмою. Відомо, що саме на цій поверхні відбувається взаємодія гормоночутливої ліпази (ферменту, що сприяє мобілізації холестеролу для потреб стероїдогенезу) та етерифікованого холестеролу, що знаходиться у матриксі ліпідної краплі [18].

Окрім зафіксованих нами змін в структурі матриксу ліпідних крапель та в їх морфометричних показниках, ми також

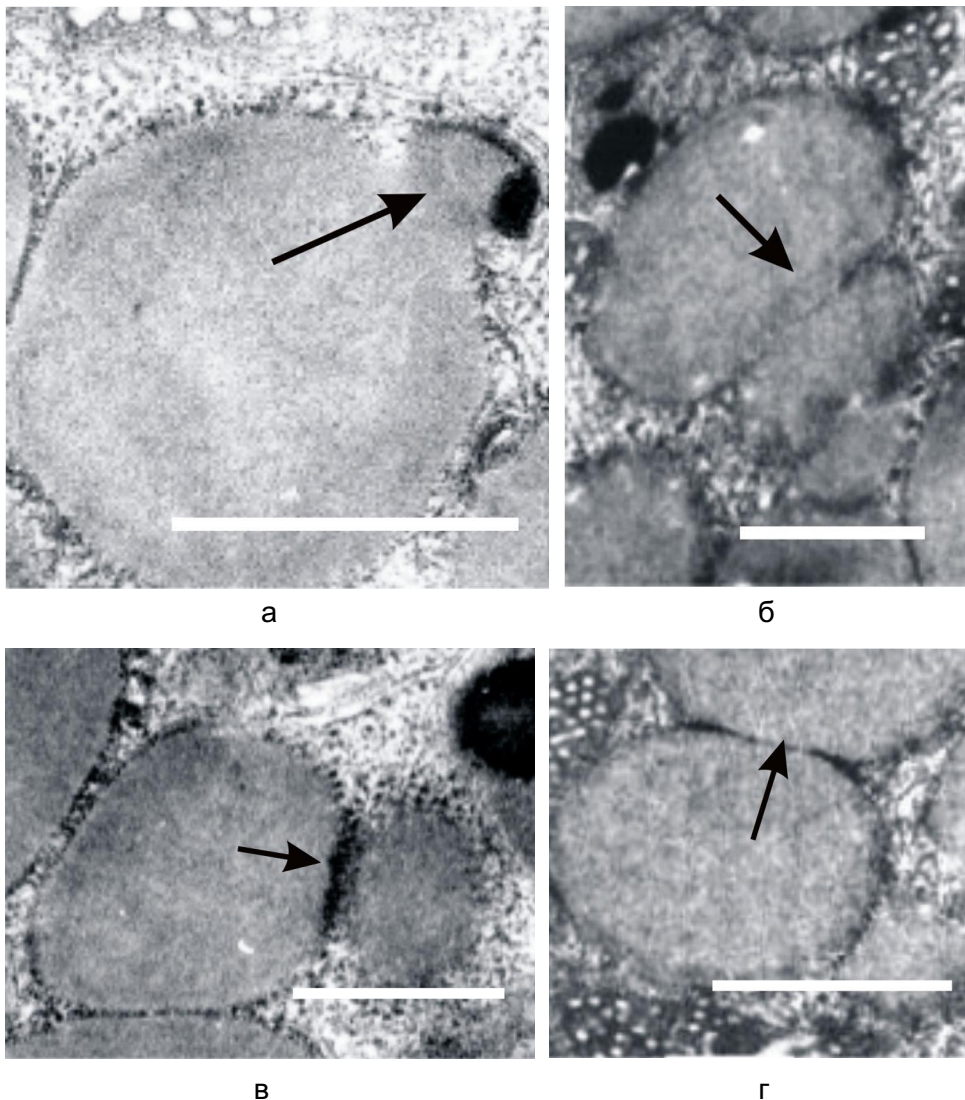


Рис. 3. Можливі етапи (а–г) дроблення ліпідних крапель.



спостерігали структурні контакти ліпідних крапель із різними внутрішньоклітинними структурами. Як у контролі, так і в дослідах ми спостерігали численні структурні контакти між ліпідними краплями та мітохондріями. Відомо, що такі контакти можуть полегшувати транспорт холестеролу від місця його депонування в ліпідних краплях до місця проходження першої реакції стероїдогенезу на внутрішній мембрані мітохондрії [7]. Механізми, що сприяють їх утворенню, залишаються маловивченими, але вважається, що у перенесенні ліпідних крапель до мітохондрій важливу роль можуть відігравати проміжні філаменти та актинові мікрофіламенти [7, 18].

Також ми спостерігали структурні контакти між ліпідними краплями та гЕПР. При цьому мембрани гЕПР одночасно могли контактувати із мітохондріями. Можливо, що така взаємодія може бути корисною для перенесення холестеролу від ліпідних крапель до місця першої реакції стероїдогенезу в мітохондріях. Таке припущення підтверджується літературними даними [10]. Автори показали, що в не стимульованих лютеїнезуючим гормоном клітинах

Лейдига холестерол виявляється лише в ліпідних краплях та плазматичній мембрані, тоді як після стимуляції його можна було також спостерігати в мембранах гЕПР і мітохондріях.

Мобілізація холестеролу з ліпідних крапель внаслідок активації гормоночутливої ліпази відіграє важливу роль у прискоренні стероїдогенезу [19]. Разом із тим найбільша кількість гормоночутливої ліпази знаходиться в гЕПР [19]. Гормоночутлива ліпаза може переноситися до мембрани ліпідних крапель при активації цАМФ-залежних механізмів [6, 11]. Можливо, що наявність контактів між мембранами гЕПР та ліпідними краплями може мати важливе значення для перенесу гормон чутливої ліпази на мембрани ліпідних крапель і, таким чином, позитивно впливати на інтенсивність стероїдогенезу.

Також у контролі та в досліді ми часто спостерігали наявність контактів між ліпідними краплями та ядром клітини (рис. 4,а). Відомо, що холестерол та продукти метаболізму жирних кислот можуть регулювати експресію деяких генів, що беруть участь у регуляції транспорту ліпідів у

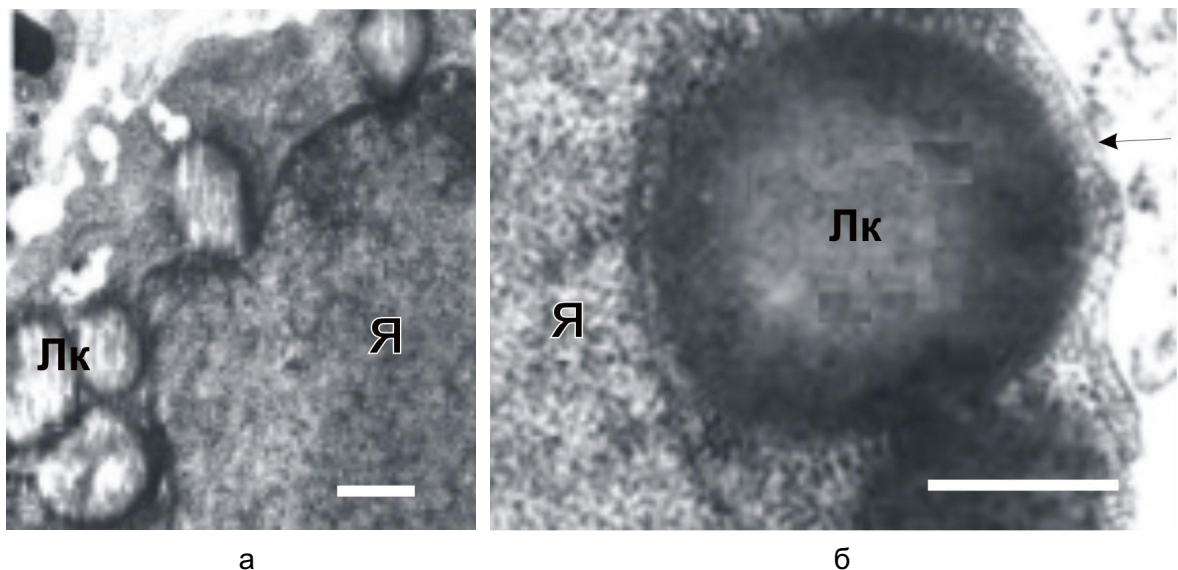


Рис. 4. Контакти між ліпідними краплями та ядром клітини (а), між ліпідними краплями та плазматичною мембраною (б). Лк – ліпідні краплі, Пм – плазматична мембрана, Я – ядро клітини

клітині [16]. Так, холестерол бере участь у регуляції активності гена кавеоліну (білка, що виявляється у мембрані ліпідних крапель) і у захопленні холестеролу із позаклітинного середовища, а також у його транспорті в цитоплазмі клітини [15]. Таким чином, при подальшому вивченні функції описаних нами структурних контактів між ліпідними краплями та ядром буде важливим з'ясування можливого значення цього явища для регуляції активності геному клітини та відповідної модуляції різних внутрішньоклітинних процесів і, зокрема, стероїдогенезу.

Викликає інтерес здатність ліпідних крапель взаємодіяти із плазматичною мембраною (див. рис. 4,б). Відомо, що певна кількість кортикостерону може знаходитись у ліпідних краплях, а саме, 65–79 % від його загальної кількості у клітині [12]. Отже, можливо, що така взаємодія може сприяти перенесенню гідрофобної молекули кортикостерону із матриксу ліпідної краплі у позаклітинний простір і таким чином реалізовувати секрецію стероїдних гормонів.

Таким чином, ці досліді показали наявність двох типів осміюфільності ліпідних крапель в клітинах пучково-сітчастої зони кори надниркових залоз щура, що корелюють із наявністю в ультраструктурі клітини ознак швидкого або повільного перебігу процесу стероїдогенезу. Також було описано здатність ліпідних крапель формувати структурні контакти із органами різних типів, що можуть також мати і функціональне значення.

Отже, отримані нами результати підтверджують думку про те, що ліпідні краплі є не тільки складними структурами, але також можуть взаємодіяти із різними органами, котрі беруть участь у стероїдогенезі, що в свою чергу може бути пов'язаним із багатогранністю ролі, яку ліпідні краплі відіграють у процесі синтезу стероїдних гормонів.

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

### **FEATURES OF LIPID DROPLETS ULTRASTRUCTURE IN RAT ADRENOCORTICAL CELLS FROM ZONA FASCICULATA-RETICULARIS**

One day cultured adrenocortical cells from zona fasciculata-reticularis were used in morphological experiments. The electron-microscopic and imaging analysis methods were used for the investigation of intracellular ultrastructure of these cells. Experiments which conducted in control conditions, allowed us to allocate three types of cells which differed by ultrastructure of the mitochondria, lipid droplets, smooth endoplasmic reticulum and dense bodies. It was shown that lipid droplets with light and homogeneous matrix, met more often in cells with morphological attributes of high intensity of steroidogenesis. On the contrary, lipid droplets, with dark matrix and a dense edging, met more often in cells which having morphological attributes of low intensity of steroidogenesis. Ionophore A23187 or adrenocorticotrophic hormone application resulted in reduction of lipid droplets diameter and in simultaneous increase in density of their arrangement in cytoplasm. At the same time droplet matrix became light and homogeneous in all cells. Thus, the ultrastructure of lipid droplet matrix is sensitive to change of calcium ions concentration in cytoplasm. Processes which result in change of lipid droplet ultrastructure, probably, are connected to steroidogenesis, nevertheless, this question requires further investigation. The lipid droplets' ability to form morphological contacts with smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, nuclear and cellular membranes is also discussed.

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гордиенко В.М., Козырецкий В.Г. Ультраструктура желез эндокринной системы. – К.: Здоров'я, 1978. – 137 с.
2. Коваль Л.М., Яворская Е.Н., Лукьянец Е.А., Токар С.Л. Ультраструктурные характеристики стероидных везикул и митохондрий из адренокортикальных клеток быка// *Нейрофизиология/Neurophysiology*. – 2000. – **32**. – С. 272–274.
3. Токар С.Л., Коваль Л.М., Лукьянец О.О., Яворська О.М. Особливості ультраструктури культуральних клітин кори надниркових залоз щура у нормі та після аплікації кальцієвого іонофору A23187 та АКТГ// *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**. – С. 105–110.
4. Andreis P.G., Rebuffat P., Belloni A.S., Neri G., Cavallini L. et al. Stereological and functional investigation on isolated adrenocortical cells: zona fasciculata/reticularis cells of chronically ACTH-treated rats// *Cel Tissue Res*. – 1989. – **258**, №1. – P. 43–51.
5. Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Guse-Behling

- H., Scherbaum W.A. Structure and dynamics of adrenal mitochondria following stimulation with corticotropin releasing hormone // *Anat. Rec.* – 1992. – **234**, №2. – P. 255–262.
6. Clifford G.M., Londos C., Kraemer F.B. et al. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, №7. – P. 5011–5015.
  7. Hall P.F., Almahbobi G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis // *Microsc. Res. Tech.* – 1997. – **36**, №6. – P. 463–479.
  8. Koizuka S. Electron microscopic studies on the effect of ACTH and flavin adenine dinucleotide on adrenocortical atrophy of hypophysectomized rat // *Acta Pathol Jpn.* – 1977. – **27**, №5. – P. 637–645.
  9. Koval L.M., Yavorskaya E.N., Lukianetz E.A. Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures // *Neuroscienc.* – 2000. – **96**. – P. 639–649.
  10. Mendis-Handagama S.M. Peroxisomes and intracellular cholesterol trafficking in adult rat Leydig cells following Luteinizing hormone stimulation // *Tissue Cell.* – 2000. – **32**, № 1. – P. 102–106.
  11. Morimoto C., Kameda K., Tsujita T., Okuda H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells // *J. Lipid Res.* – 2001. – **42**. – P. 120–127.
  12. Mrotek J.J., Mathew J.K., Curtis J.C., Johansson K.R. A method for the isolation of lipid droplet fractions from decapsulated rat adrenals // *Steroids.* – 1981. – **38**, №2. – P. 229–241.
  13. Orso E., Toth I.E., Szabo D., Szilagy G. Changes in adrenocortical lipid fluidity of hyperfunctioning human adrenals // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 1992. – **41**, №3–8. – P. 791–793.
  14. Ostermeyer A.G., Paci J.M., Zeng Y. et al. Accumulation of caveolin in the endoplasmicreticulum redirects the protein to lipid storage droplets // *J. Cell. Biol.* – 2001. – **152**, №5. – P. 1071–1078.
  15. Pola A., Lutterforsta R., Lindsay M. et al. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance // *J. Cell. Biol.* – 2001. – **152**, №5. – P. 1057–1070.
  16. Saltiel A.R. Another hormone-sensitive triglyceride lipase in fat cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**, №2. – P. 535–537.
  17. Tauchi-Sato K., Ozeki S., Houjou H. et al. The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, №46. – P. 44507–44512.
  18. Thomson M. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis // *Horm. Metab Res.* – 1998. – **30**, №1. – P. 16–28.
  19. Wen-Jun S., Vanita N., Shailja P. et al. Adrenal Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase: Identification, Subcellular Distribution, and Sex Differences // *Endocrinology.* – 2002. – **143**, №3. – P. 801–806.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 02.11.20004*