

М.Ю. Капитонова<sup>1</sup>, М. Улла<sup>1</sup>, С.Л. Кузнецов<sup>2</sup>, В.В. Хлебников<sup>3</sup>, М.Н.К. Нор-Ашикин<sup>1</sup>, А. Ахмад<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет Технологии МАРА, Селангор, Малайзия

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация

<sup>3</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, Российская Федерация

## Возрастная морфофункциональная характеристика фолликуло-звездчатых клеток гипофиза крыс при стрессе

98

Фолликуло-звездчатые клетки известны как белок S-100-положительные клетки передней доли гипофиза, не продуцирующие гормонов, и, возможно, являющиеся органоспецифическими стволовыми клетками аденогипофиза. Их роль в адаптации организма к стрессу не выяснена. **Цель исследования:** установить динамику популяции фолликуло-звездчатых клеток аденогипофиза у крыс в условиях хронического стресса, а также ее корреляцию со стресс-ассоциированной динамикой гормонпродуцирующих клеток. **Материалы и методы:** крысы породы Sprague Dawley в возрасте 1, 3, 6 и 12 мес подвергались действию хронического иммерсионно-иммобилизационного стресса. Гистологические срезы гипофиза окрашивали иммуногистохимически с последующим имидж-анализом. **Результаты:** в аденогипофизе контрольных крыс фолликуло-звездчатые клетки демонстрировали отчетливую тенденцию к увеличению своей доли с возрастом, обнаруживая при этом отрицательную корреляцию с числом АКПГ-позитивных клеток. У экспериментальных животных в возрасте 1 и 3 мес удельная площадь белок S-100-иммунореактивных клеток в передней доле гипофиза уменьшалась и обратно коррелировала с числом кортикотропических, в то время как у шестимесячных крыс она уменьшалась незначительно, а у двенадцатимесячных — имела тенденцию к увеличению. **Выводы:** результаты исследования свидетельствуют о способности фолликуло-звездчатых клеток диверсифицированно участвовать в модуляции пластичности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси при хроническом действии стрессоров в различном возрасте.

**Ключевые слова:** гипофиз, фолликуло-звездчатые клетки, стресс, иммуногистохимия, имидж-анализ.  
(Вестник РАМН. 2013; 11: 98–102)

### Введение

Фолликуло-звездчатые клетки — это важнейшие агранулярные клетки передней доли гипофиза, обеспечивающие дополнительный контроль за деятельностью гормонпродуцирующих клеток аденогипофиза [1, 2]. Обнаруженные 60 лет назад при помощи электронной микроскопии [3], они вначале были описаны как хромобластные клетки звездчатой формы, способные обра-

зовывать фолликулы. Позднее было доказано, что они являются единственным типом клеток в аденогипофизе, иммунопозитивным по белку S100, что послужило толчком к их изучению и позволило описать их многочисленные функции [4]. Эти клетки формируют в аденогипофизе сложную трехмерную сеть, в образовании которой важную роль играет секреция ими хемокина CXCL12 и образование оси CXCL12 /CXCR4; обладают сквенджерной активностью, позволяющей им фагоцитировать дегенери-

M.Y. Kapitonova<sup>1</sup>, M. Ullah<sup>1</sup>, S.L. Kuznetsov<sup>2</sup>, V.V. Khlebnikov<sup>3</sup>, M.N.K. Nor-Ashikin<sup>1</sup>, A. Ahmad<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UiTM, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup> First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Russian Federation

<sup>3</sup> Volgograd State Medical University, Russian Federation

## Age-Related Changes of the Pituitary Folliculo-Stellate Cells in Rats in Chronic Stress

Folliculo-stellate cells are known as S-100 protein immunopositive cells of the anterior lobe of pituitary gland which are not secreting hormones and are presumed to be organ specific stem cells of the adenohypophysis. Their role in adaptation of the body to stress remains unclear. **Aim:** to evaluate dynamics of folliculo-stellate and hormone-producing cells in rats of different age in chronic stress exposure. **Materials and methods:** sprague-dawley rats aged 1, 3, 6 and 12 months were exposed to chronic immersion immobilization stress. Histological section of the pituitary glands were stained immunohistochemically with subsequent image analysis. **Results:** in control rats S-100 protein-immunopositive cells increased in number with age and negatively correlated with the number of ACTH-positive cells. In experimental animals aged 1 and 3 months volume density of S-100 protein-immunoreactive cells significantly decreased and negatively correlated with ACTH-positive cells, while in 6 month old rats it was only slightly decreased and in 12 months old animals showed tendency to increase. **Conclusions:** results of the study demonstrating capacity of the folliculo-stellate cells to contribute to the plasticity of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis in chronic stress exposure at different age.

**Key words:** pituitary gland, folliculo-stellate cells, stress, immunohistochemistry, image-analysis.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 11: 98–102)

рующие клетки; вырабатывают факторы роста и цитокины (IL 6, основной фактор роста фибробластов и другие), осуществляя паракринную регуляцию гормональной активности аденогипофиза. Фолликуло-звездчатые клетки участвуют в сложных сигнальных взаимодействиях с другими клетками, образуют многочисленные межклеточные соединения (главным образом щелевые контакты) своими длинными цитоплазматическими отростками [5–11]. В последнее время им приписывают роль органоспецифических стволовых клеток аденогипофиза, т.к. клетки обладают способностью к трансдермальной дифференцировке [8, 12]. Предположение о существовании клеток-предшественников в аденогипофизе ранее выдвигалось многими исследователями, пытавшимися объяснить чрезвычайно высокую функциональную пластичность аденогипофиза как центрального звена гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси, участвующей в реализации многих функций организма, в частности в его адаптации к стрессу. Возрастные особенности фолликуло-звездчатых клеток исследованы мало, а их роль в адаптации организма к стрессу остается неизученной.

Цель исследования: установить динамику популяции фолликуло-звездчатых клеток аденогипофиза у крыс в условиях хронического стресса, а также ее связь со стресс-ассоциированной динамикой гормонопродуцирующих клеток.

## Материалы и методы

### Участники исследования

Исследование выполнено на 48 крысах породы Sprague Dawley в возрасте 30 дней, 3, 6 и 12 мес, по 12 особей в каждой возрастной группе: 6 экспериментальных и 6 контрольных. Животные содержались в стандартных виварных условиях при температуре  $20 \pm 2$  °C с доступом к воде и пище *ad libitum*. Экспериментальные животные ежедневно на протяжении 7 сут по 5 ч в день подвергались действию хронического иммерсионно-иммобилизационного стресса [13]. Контрольные животные содержались в отдельном помещении вне аудиовизуального контакта с экспериментальными животными. По окончании последней сессии экспериментального воздействия животных забивали путем декапитации под анестезией, эндокринные железы (гипофиз, надпочечники) фиксировали формалином и заливали в парафин.

### Методы исследования

Срезы гипофиза окрашивали гематоксилином и эозином и иммуногистохимически, моноклональными антителами против адренкортикотропного гормона (АКТГ) (клон 02A3, синтетический иммуноген, конъюгированный с IgG цыпленка) — маркера кортикотропцитов (ДАКО, #M3501, Дания), PCNA (клон PC10) — ядерного антигена пролиферирующих клеток (Серотек, #MCA1558, США), поликлональными антителами против белка S100 (ДАКО, #Z0311, Дания). Окрашивание проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом с подавлением эндогенной пероксидазы, обработкой блокирующей неиммунной сывороткой для предотвращения фоновой окраски, высвобождением эпитопов антигенов (для АКТГ) по стандартным методикам в соответствии с рекомендациями производителей реактивов. Удельную площадь и численную плотность иммунопозитивных клеток определяли с применением программы Image-Pro+ 7.0 (Media Cybernetics, США), которая была сопряжена с программой Excel.

### Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных включала определение средней арифметической, среднеквадратического отклонения, ошибки репрезентативности, достоверности различий по *t*-критерию Стьюдента и корреляционный анализ по критерию Пирсона.

## Результаты и обсуждение

У экспериментальных животных всех возрастных групп обнаружены признаки стресса: акцидентальная инволюция тимуса (у неполовозрелых и молодых крыс), гипертрофия надпочечников и кровоизлияния / изъязвления на слизистой оболочке желудка. Динамика относительной массы гипофиза показала достоверное ее снижение с возрастом и повышение при стрессе у большинства возрастных групп (рис. 1).

Представлены изображения гистологически и иммуногистохимически окрашенных срезов аденогипофиза экспериментальных и контрольных крыс (рис. 2, а–з). В аденогипофизе при хроническом стрессе у экспериментальных животных всех 4 возрастных групп отмечались микроциркуляторные нарушения в виде полнокровия капилляров и венул, гипертрофия эндокриноцитов, увеличение числа и доли базофильных клеток (более характерное для животных первых 3 возрастных групп), усиление фолликуло- и кистообразования, особенно характерное для животных 2 старших возрастных групп.

С возрастом доля кортикотропцитов в дистальной части аденогипофиза уменьшается (причем начиная с шестимесячного возраста — высокодостоверно;  $p < 0,01$ ) (рис. 3). Увеличение удельной площади кортикотропцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) при действии стрессора для всех возрастных групп, кроме двенадцатимесячных крыс, у которых данный показатель увеличивается незначи-

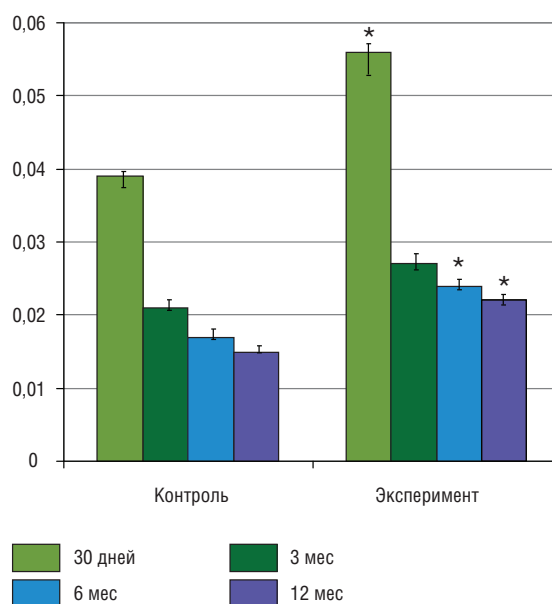
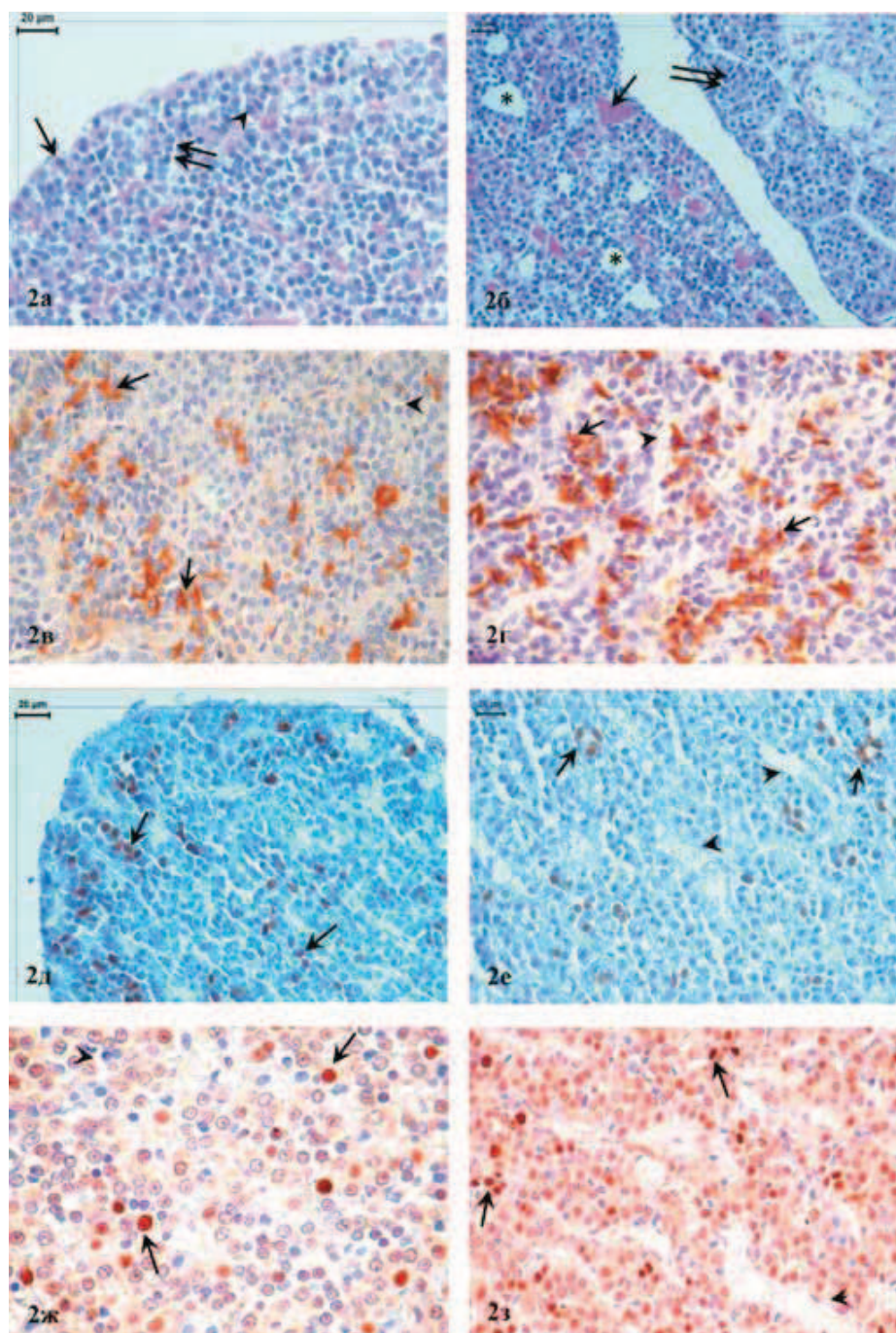


Рис. 1. Относительная масса гипофиза (%) экспериментальных и контрольных животных,  $M \pm m$ .

Примечание. Здесь и на рис. 3–5. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  — достоверность различий по сравнению с контролем; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  — достоверность различий по сравнению с возрастом 30 дней.



**Рис. 2.** Микрофотографии аденогипофиза контрольных и экспериментальных животных.

*Примечание.* (а, б) — гипофиз 30-дневных крыс: (а) контрольной и (б) экспериментальной групп. Окраска гематоксилином и эозином. Исх. ув.  $\times 400$ . а) на фоне высокой клеточности в передней доле преобладают хромофобы с характерными цепочками сближенных ядер (двойная стрелка). Среди хромофилов доминируют ацидофилы с эксцентричными ядрами (стрелка); базофилы (головка стрелки) немногочисленны. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$ . б) в передней доле — полнокровные капилляры (стрелка) и многочисленные фолликулы и кисты (\*); промежуточная доля — двойная стрелка. (в, г) — аденогипофиз двенадцатимесячных крыс: (в) контрольной и (г) экспериментальной групп. Окраска на АКГГ, докраска гематоксилином. Исх. ув.  $\times 400$ . в) иммунореактивные клетки яркой окраски, характерной отростчатой формы, одиночные или собранные в группы по 2–3 клетки (стрелки); синусоиды — головка стрелки. г) гиперплазия иммунореактивных клеток (стрелки), синусоиды (головка стрелки) расширены. (д, е) — аденогипофиз 30-дневных крыс: (д) контрольной и (е) экспериментальной групп. Окраска на белок S-100, докраска гематоксилином. Исх. ув.  $\times 400$ . д) иммунореактивные клетки яркой окраски, характерной отростчатой формы, одиночные или собранные в группы по 2–3 клетки (стрелки); синусоиды — головка стрелки. е) гиперплазия иммунореактивных клеток (стрелки), синусоиды (головка стрелки) расширены. (ж, з) — аденогипофиз трехмесячных крыс: (ж) контрольной и (з) экспериментальной групп. Окраска на PCNA, докраска гематоксилином. Исх. ув.  $\times 400$ . ж) ядра немногочисленных иммунореактивных клеток ярко окрашены (стрелки); синусоиды — головка стрелки. Окрашивание на PCNA. з) иммунореактивные клетки многочисленны (стрелки); синусоиды (головка стрелки) зияют.



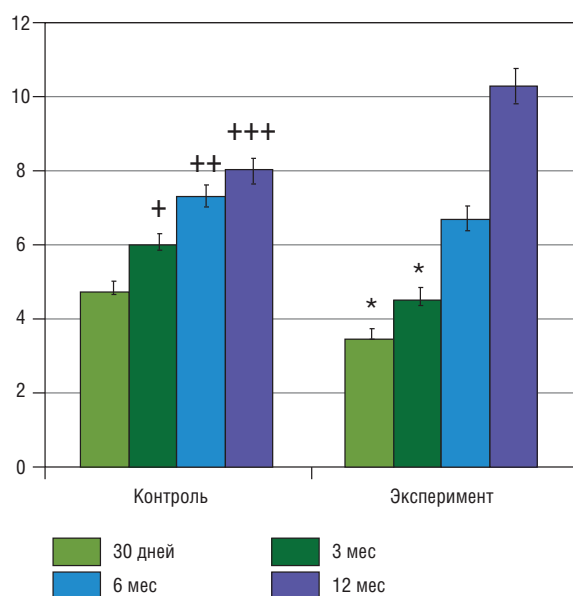


Рис. 3. Удельная площадь (%) фолликуло-звездчатых клеток аденогипофиза экспериментальных и контрольных животных,  $M \pm m$ .

тельно (см. рис. 3). Митотическую пластичность аденогипофиза оценивали при окрашивании PCNA. Отмечено, что доля иммунореактивных клеток в целом невелика; они достаточно равномерно распределены в паренхиме аденогипофиза, однако в латеральных крыльях их плотность несколько выше, чем в базофильном клине. Число иммунореактивных клеток с возрастом имеет тенденцию к уменьшению. У экспериментальных животных этот показатель незначительно увеличивался во всех возрастных группах при стрессе, однако достоверным увеличение было только при действии у животных неполовозрелого и молодого возраста ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно) (рис. 4). Окрашивание на белок S100, специфически выявляющее в аденогипофизе фолликуло-звездчатые клетки, показало, что в неполовозрелом возрасте эти клетки немногочисленны, как правило, не имеют звездчатой формы, а чаще это мелкие округлые клетки, равномерно распределенные по паренхиме железы, расположенные поодиночке вне связи с фолликулами, которые в данной возрастной группе встречаются нечасто. С возрастом их число неуклонно растет ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  при сравнении неполовозрелых контрольных животных с молодыми, зрелыми и стареющими, соответственно; рис. 5), и они начинают приобретать угловатую форму. В стареющем организме они становятся отчетливо звездчатыми, образуют скопления, как в связи с фолликулами, так и за их пределами. При хроническом действии стрессора у неполовозрелых и молодых животных данный показатель достоверно уменьшается ( $p < 0,05$ ); у зрелых животных он снижается незначительно, в то время как у стареющих он повышается. Корреляционный анализ показал, что сильная обратная корреляция имела место между удельной площадью АКТГ- и белок S-100-иммунореактивных клеток при хроническом стрессе в молодом возрасте, средняя по силе достоверная связь между этими показателями обнаружена у неполовозрелых особей ( $r = -0,72$ ;  $p < 0,05$  и  $r = -0,64$ ,  $p < 0,05$ , соответственно). В остальных группах связь была слабой и недостоверной.

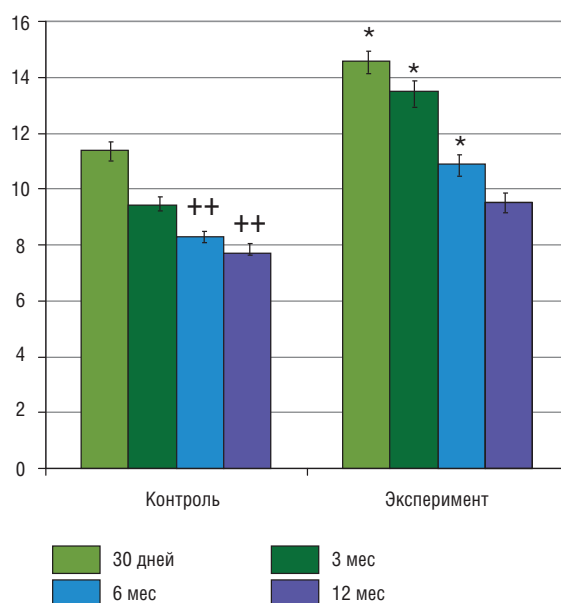


Рис. 4. Удельная площадь (%) АКТГ и клеток аденогипофиза экспериментальных и контрольных животных,  $M \pm m$ .

101

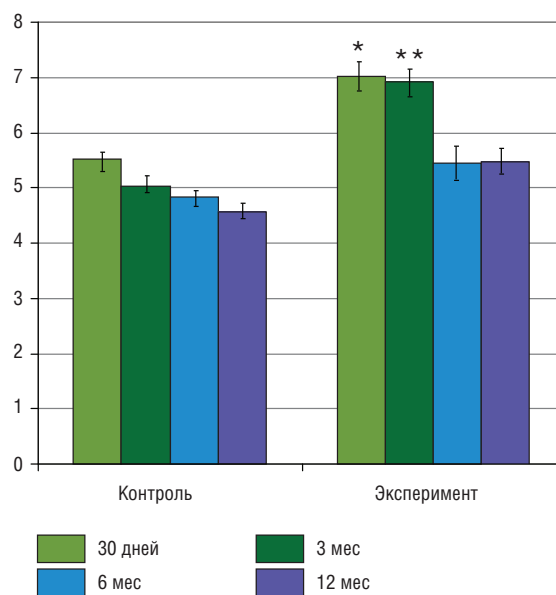


Рис. 5. Удельная площадь (%) PCNA и клеток аденогипофиза экспериментальных и контрольных животных,  $M \pm m$ .

Способность фолликулярно-звездчатых клеток выступать в качестве органоспецифических клеток признают не все исследователи, и до настоящего времени она остается предметом дискуссии. В ряде исследований основное значение придают их тропности к фолликулам аденогипофиза, а функциональные акценты в отношении данной клеточной популяции смещают в сторону скведжерной функции и их роли в межклеточных взаимодействиях эндокриноцитов [7, 14]. Наше исследование продемонстрировало, что большое число фолликуло-звездчатых клеток обнаруживается в гипофизе вне связи с фолликулами. Эта клеточная популяция показала отчетливую возрастную динамику в сторону увеличения своего представительства по мере старения, а также весьма неоднозначную

стресс-ассоциированную динамику, разнонаправленную в различных возрастных группах. В раннем и молодом возрасте при хроническом стрессе удельная площадь белок S-100-иммунореактивных клеток в передней доле гипофиза уменьшается и обратно коррелирует с числом кортикотропцитов. В зрелом возрасте она уменьшается незначительно, а в стареющем организме имеет тенденцию к увеличению, что свидетельствует о способности фолликуло-звездчатых клеток диверсифицированно участвовать в модуляции пластичности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси в различных возрастных группах. Взаимообусловленность численности клеточных популяций фолликуло-звездчатых клеток и кортикотропцитов косвенно свидетельствует о возможном участии первых в дифференцировке последних и, как следствие, при определенных уровнях стресс-ассоциированной активации аденогипофиза, способности фолликуло-звездчатых клеток онтогенетически опосредованно обеспечивать адаптационный уровень пластичности центрального звена

гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси. Ранее нами было установлено соотношение между степенью гиперплазии кортикотропцитов и уровнем клеточной пролиферации в аденогипофизе в раннем постнатальном онтогенезе при хроническом стрессе [15]. Отмеченные закономерности позволяют предположить, что возрастная и стресс-ассоциированная динамика кортикотропцитов в аденогипофизе связана с уровнем их дифференцировки, в которой участвуют фолликуло-звездчатые клетки.

### Заключение

Обнаружение разнонаправленной динамики популяции фолликуло-звездчатых клеток в разных возрастных группах экспериментальных животных дает основание оценить их вклад в определение секреторной пластичности аденогипофиза и адаптацию центрального звена гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси к хроническому действию стрессорных агентов.

### REFERENCES

- Horiguchi K., Syaidah R., Fujiwara K. et al. Expression of the cell-surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 in developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 2013; 353 (3): 473–481.
- Tando Y., Fujiwara K., Yashiro T., Kikuchi M. Localization of Notch signaling molecules and their effect on cellular proliferation in adult rat pituitary. *Cell Tissue Res.* 2013; 351 (3): 511–519.
- Rinehart J.F., Farquhar M.G. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1953; 1: 93–113.
- Allaerts W., Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur. J. Endocrinol.* 2005; 153: 1–12.
- Soji T., Mabuchi Y., Kurono C., Herbert D.C. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 39 (2): 138–149.
- Inoue K., Mogi C., Ogawa S. et al. Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch. Physiol. Biochem.* 2002; 110 (1–2): 50–53.
- Itakura E., Odaira K., Yokoyama K. et al. Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in S-100beta-producing pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. *Endocrinology.* 2007; 148: 1518–1523.
- Devnath S., Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J. Endocrinol.* 2008; 20 (6): 687–691.
- Chauvet N., El-Yandouzi T., Mathieu M.N. et al. Characterization of adherens junction protein expression and localization in pituitary cell networks. *J. Endocrinol.* 2009; 202 (3): 375–387.
- Horiguchi K., Ilmiawati C., Fujiwara K. et al. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology.* 2012; 153 (4): 1717–1724.
- Acosta M., Mohamed F. Immunohistochemical and morphometric study of pituitary pars distalis folliculostellate cells of nonpregnant and pregnant viscachas. *Biotech. Histochem.* 2013; 88 (3–4): 161–169.
- Osuna M., Sonobe Y., Itakura E. et al. Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J. Endocrinol.* 2012; 213 (3): 231–237.
- Takagi K., Kasuya Y., Watanabe K. Studies on the drugs from peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcer in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo.)* 1964; 12: 465–472.
- Luziga C., Usui M., Yoichiro H., Kazwala R., Yamamoto Y., Mamba K. Gene expression and immunohistochemical localization of megalin in the anterior pituitary gland of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *J. Mol. Histol.* 2007; 38 (1): 65–77.
- Kapitonova M.Y., Kuznetsov S.L., Khlebnikov V.V. et al. Immunohistochemical characteristics of the hypophysis in normal conditions and chronic stress. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2010; 40 (1): 97–102.

### FOR CORRESPONDENCE

**Kapitonova Marina Yur'evna**, PhD, professor, Head of the Anatomy Department of General Medicine Faculty of University Technology MARA.

**Address:** Shah Alam, Selangor, 40150 Malaysia; **tel.:** (6017) 624-36-99; **e-mail:** marina@salam.uitm.edu.my

**Ulla Muzammil**, PhD, professor of the Anatomy Department of Dentistry Faculty of University Technology MARA.

**Address:** Shah Alam, Selangor, 40150 Malaysia; **tel.:** (6012) 963-80-75; **e-mail:** muzammil@salam.uitm.edu.my

**Kuznetsov Sergei Evovich**, PhD, professor, correspondent member of RAMS, Head of the Department of Histology and Fetology of I. M. Sechenov First MSMU.

**Address:** build. 3, 11, Mokhovaya Street, Moscow, RF, 103009; **tel.:** +7 (495) 698-56-31; **e-mail:** vakmedbiol@rambler.ru

**Khlebnikov Vladimir Vital'evich**, assistant of the Neurologic Department of Volgograd State Medical University.

**Address:** 1, Pavshikh bortsov Square, Volgograd, RF, 400066; **e-mail:** ggnuxa@yandex.ru

**Nor-Ashikin Mokhd Nur Kkhan**, PhD, assistant professor, Director of the Institute of molecular health-related biotechnologies of University Technology MARA.

**Address:** Sg Buloh, Selangor, 47000 Malaysia; **tel.:** (6012) 320-03-48; **e-mail:** noras011@salam.uitm.edu.my

**Azhar Akhmad**, postgraduate of the Anatomy Department of General Medicine Faculty of University Technology MARA.

**Address:** Shah Alam, Selangor, 40150 Malaysia; **tel.:** (6013) 246-11-06; **e-mail:** biotech.azhar@gmail.com