

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГОВОМ ВЕЩЕСТВЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭНДОКРИННОГО ДИЗРАПТОРА ДДТ В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

DOI: 10.17691/stm2020.12.2.06

УДК 612.452:577.175.52

Поступила 24.12.2019 г.



Е.П. Тимохина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы;
С.В. Назимова, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы;
Д.А. Цомартова, к.м.н., научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы;
Н.В. Яглова, д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы;
С.С. Обернихин, д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы;
В.В. Яглов, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Научно-исследовательский институт морфологии человека, ул. Цюрупы, 3, Москва, 117418

Цель исследования — изучить морфологические и цитофизиологические изменения в мозговом веществе надпочечников у половозрелых крыс, развивающиеся при воздействии низких доз эндокринного дизраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в пренатальном и постнатальном периодах.

Материалы и методы. Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar ($n=30$). Моделировали воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах ($n=10$) и только в постнатальном периоде с первого дня жизни ($n=10$). Среднесуточное самостоятельное потребление ДДТ крысами составило $3,30 \pm 0,14$ мкг/кг. Животных контрольной ($n=10$) и опытных групп выводили из эксперимента в возрасте 10 нед (постпубертатный период), когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития. Изготавливали гистологические препараты экваториальных срезов надпочечников, проводили светооптическое исследование и компьютерную морфометрию мозгового вещества. Выполняли иммуногистохимическое исследование экспрессии тирозингидроксилазы в хромоаффинных клетках. С помощью иммуноферментного анализа определяли содержание адреналина в плазме крови крыс.

Результаты. Установлено, что воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм крысы нарушает формирование мозгового вещества надпочечников и цитофизиологию хромоаффинных клеток. Особенностью воздействия, начавшегося в пренатальном периоде, является более выраженное отставание в развитии мозгового вещества у половозрелых животных по сравнению с последствиями воздействия на организм с начала постнатального периода, что подтверждает уменьшение размеров мозгового вещества, а также общей площади хромоаффиноцитов в его срезе. Воздействие, начавшееся с постнатального периода, проявляется более значительными функциональными нарушениями, заключающимися в снижении синтеза фермента тирозингидроксилазы в цитоплазме хромоаффинных клеток и увеличении количества тирозингидроксилаза-отрицательных хромоаффиноцитов в срезе мозгового вещества, что приводит к снижению концентрации адреналина в плазме крови крыс.

Заключение. Воздействие низких доз ДДТ, начавшееся на ранних этапах развития, приводит к морфологическим и цитофизиологическим изменениям в мозговом веществе надпочечников у половозрелых крыс, обуславливающим снижение функциональной активности хромоаффинных клеток, что позволяет рассматривать эндокринный дизраптор ДДТ как потенциальный фактор риска, нарушающий функционирование нейроэндокринной системы.

Ключевые слова: эндокринные дизрапторы; ДДТ; надпочечник; хромоаффинные клетки; функционирование эндокринной системы; катехоламины; адреналин; тирозингидроксилаза.

Как цитировать: Timokhina E.P., Nazimova S.V., Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Morphological and cytophysiological changes in the adult rat adrenal medulla after prenatal and postnatal exposure to endocrine-disrupting DDT. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2020; 12(2): 50–55, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.2.06>

Для контактов: Яглова Наталья Валентиновна, e-mail: yaglova@mail.ru

English

Morphological and Cytophysiological Changes in the Adult Rat Adrenal Medulla after Prenatal and Postnatal Exposure to Endocrine-Disrupting DDT

E.P. Timokhina, PhD, Researcher, Laboratory of Endocrine System Development;
 S.V. Nazimova, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development;
 D.A. Tsomartova, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Endocrine System Development;
 N.V. Yaglova, MD, DSc, Head of the Laboratory of Endocrine System Development;
 S.S. Obernikhin, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development;
 V.V. Yaglov, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Endocrine System Development

Research Institute of Human Morphology, 3 Tsurupa St., Moscow, 117418, Russia

The aim of the investigation was to study morphological and cytophysiological changes in the adult rat adrenal medulla after prenatal and postnatal exposure to endocrine-disrupting chemical dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT).

Materials and Methods. The experiment was carried out on male Wistar rats (n=30). The rats were exposed to low doses of DDT during prenatal and postnatal development (n=10) and during postnatal development (n=10) only. The average daily intake of DDT by rats was $3.30 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{kg}$. The control (n=10) and experimental animals were sacrificed at the age of 10 weeks (post-puberty), when rat adrenal glands reached their maximum development. Histological samples of the equatorial sections of the adrenal glands were prepared. The adrenal medulla was studied using light microscopy and computer morphometry. Immunohistochemistry was performed to evaluate tyrosine hydroxylase expression in chromaffin cells. Plasma epinephrine content was measured using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Postnatal exposure of rats to low doses of the endocrine disruptor was found to interfere with adrenal medulla development and cytophysiology of chromaffin cells. Prenatal and postnatal exposure resulted in more profound delay in adrenal medulla development of adult rats as compared to the values of rats exposed postnatally, which was manifested by reduced area of the adrenal medulla and reduced total area of chromaffin cells in its section. Postnatal exposure is manifested by more significant functional disorders including decreased synthesis of tyrosine hydroxylase enzyme in the cytoplasm of chromaffin cells and elevated number of tyrosine-hydroxylase-negative cells in the medulla section, leading to a decrease in plasma epinephrine concentration.

Conclusion. Exposure to low doses of DDT in the early stages of development leads to morphological and cytophysiological changes in the adult rat adrenal medulla and, therefore, reduced functional activity of chromaffin cells, which allows considering the endocrine disruptor DDT a potential risk factor disrupting the function of the neuroendocrine system.

Key words: endocrine disruptors; DDT; adrenal gland; chromaffin cells; the function of the neuroendocrine system; catecholamines; epinephrine; tyrosine hydroxylase.

Введение

В 1993 г. в науку был введен термин «эндокринные дизрапторы», к которым отнесены химические соединения, нарушающие функцию нейроэндокринной системы [1, 2]. Одним из наиболее распространенных нейроэндокринных дизрапторов является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Его метаболиты обнаруживаются в живых организмах по всему земному шару [3, 4]. На данный момент способность низких доз ДДТ оказывать дизрапторное действие на продукцию биогенных аминов остается неизученным аспектом проблемы. Особую значимость такие исследования приобретают в связи с увеличением числа нарушений поведения и формирования поведенческих реакций у детей и взрослых, что рядом авторов связывается с постоянным низкодозовым воздействием на организм различных химических веществ антропогенного происхождения [2, 5, 6].

Ранее нами [7, 8] было установлено, что воздейст-

вие низких доз ДДТ на крыс в пренатальном и постнатальном периодах развития приводит к снижению концентрации норадреналина и адреналина в системном кровотоке. У крыс адреналин надпочечников составляет более 80% от его общего содержания в системном кровотоке, а большая часть норадреналина поступает в кровь из симпатического отдела вегетативной нервной системы [7]. Однако механизм нарушений синтеза биогенных аминов непонятен.

Целью данного исследования стало изучение морфологических и цитофизиологических изменений в мозговом веществе надпочечников у половозрелых крыс, развивающихся при воздействии низких доз эндокринного дизраптора ДДТ.

Материалы и методы

Исследование проведено на самцах крыс линии Wistar (n=30). Моделировали воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм: пренатальное

и постнатальное воздействие (1-я опытная группа, n=10) и только постнатальное воздействие с первого дня жизни (2-я опытная группа, n=10).

Самки крыс 1-й опытной группы 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 данной группы получало низкие дозы ДДТ с молоком матери. По достижении трехнедельного возраста это потомство было переведено на самостоятельное вскармливание с заменой питьевой воды на аналогичный раствор ДДТ. Во 2-ю опытную группу вошли крысы, потреблявшие ДДТ только в постнатальном периоде с первого дня жизни: сначала с молоком матери, а затем самостоятельно.

Среднесуточное самостоятельное потребление ДДТ крысами составило $3,30 \pm 0,14$ мкг/кг массы тела. Расчет потребляемой дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к определению низких доз для ДДТ и нормативов содержания данного дизраптора в продуктах питания в России [9].

Животные контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Крыс контрольной и опытных групп выводили из эксперимента передозировкой Золетила в возрасте 10 нед (постпубертатный период), когда надпочечники достигают своего максимального развития [10].

Надпочечники фиксировали в растворе Буэна, после гистологической проводки изготавливали экваториальные парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли площадь мозгового вещества, суммарную площадь хромаффинных клеток в нем и их размеры. Наличие тирозингидроксилазы (ТГ) определяли иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных кроличьих антител (Abcam, Великобритания). Реакцию визуализировали с помощью коммерческой тест-системы (Abcam). Срезы докрашивали гематоксилином Майера. В срезе мозгового вещества подсчитывали процент ТГ-положительных и ТГ-отрицательных хромаффиноцитов. Среди ТГ-положительных клеток выявляли долю клеток с диффузным и локальным распределением фермента в цитоплазме, для чего проводили микроскопию иммунопозитивных клеток при увеличении в 1000 раз и морфометрическое определение площади иммунопозитивных участков. Под диффузным распределением понимали наличие ТГ в 90–100%, под локальным — менее чем в 90% площади цитоплазмы хромаффинных клеток.

Светооптическое исследование гистологических препаратов надпочечников и компьютерную морфометрию препаратов выполняли с помощью программы Image Scope и светового микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия).

Плазму получали из крови путем добавления эти-

лендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В ней оценивали содержание адреналина иммуноферментным методом с помощью высокочувствительного набора реактивов CatCombi (IBL International, Германия) с минимально определяемым содержанием адреналина 0,03 нмоль/л.

Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), а также с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Работа одобрена Этическим комитетом Научно-исследовательского института морфологии человека.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Лиллиефорса, Шапиро–Уилка. Центральные тенденции и рассеяние количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего ($M \pm m$). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, по качественному признаку — с помощью χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Надпочечники крыс контрольной группы имели типичное строение. На гистологических срезах четко различалось корковое и мозговое вещество. В мозговом веществе выявлялись скопления хромаффинных клеток, площадь которых составляла более двух третей от общей площади мозгового вещества (см. таблицу). Хромаффинные клетки имели крупные округлые ядра и умеренно базофильную цитоплазму. Большинство хромаффинных клеток демонстрировали интенсивную иммуногистохимическую реакцию на ТГ с диффузным распределением фермента в цитоплазме. ТГ-положительные клетки с локальным распределением фермента в цитоплазме выявлялись значительно реже. Также встречались единичные ТГ-отрицательные клетки (рис. 1 и 2, а).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза, надпочечники также имели типичное строение. Однако отмечено уменьшение площади мозгового вещества по сравнению с контрольной группой. Площадь скоплений хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества была статистически значимо меньше контрольных значений. Сравнение размеров хромаффинных клеток данной и контрольной группы не выявило различий (см. таблицу). Отмечено

Морфологические характеристики надпочечников половозрелых крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в различные этапы онтогенеза (M±m)

Показатели	Контрольная группа	Пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ	Постнатальное воздействие ДДТ
Площадь мозгового вещества, мкм ²	812000,00±8315,22	598200,00±45313,12*	757000,00±41000,00#
Общая площадь хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества, мкм ²	578850,00±21767,91	394938,00±46496,07*	544700,00±19100,00#
Площадь хромаффинной клетки, мкм ²	108,39±1,97	112,32±4,40	99,99±3,25#

* — статистически значимые отличия от значений контрольной группы; # — отличия группы «постнатальное воздействие ДДТ» от группы «пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ».

уменьшение количества ТГ-положительных клеток (см. рис. 1, рис. 2, б), при этом большая их часть имела локальное распределение фермента в цитоплазме. Статистически значимо увеличилось количество ТГ-отрицательных хромаффиноцитов. Концентрация адреналина в плазме крови была меньше на треть по сравнению со значением у крыс контрольной группы (рис. 3).

У животных, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде, надпочечники также имели типичное строение. Площадь мозгового вещества была статистически значимо большей, чем у 1-й опытной группы, и не отличалась от контрольных значений. Общая площадь хромаффинных клеток в срезе мозгового вещества также не имела отличий от контрольных показателей и была больше, чем в группе крыс, получавших ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза. При этом размеры самих хромаффиноцитов были уменьшены по сравнению с клетками как контрольной, так и предыдущей опытной группы (см. таблицу). Количество ТГ-положительных клеток было наименьшим среди всех исследуемых животных (см. рис. 1). В большинстве хромаффинных клеток ТГ не выявлялась (рис. 2, в). Установлено значительное снижение концентрации адреналина в плазме крови



Рис. 1. Количество ТГ-положительных и ТГ-отрицательных клеток в мозговом веществе надпочечников исследуемых крыс

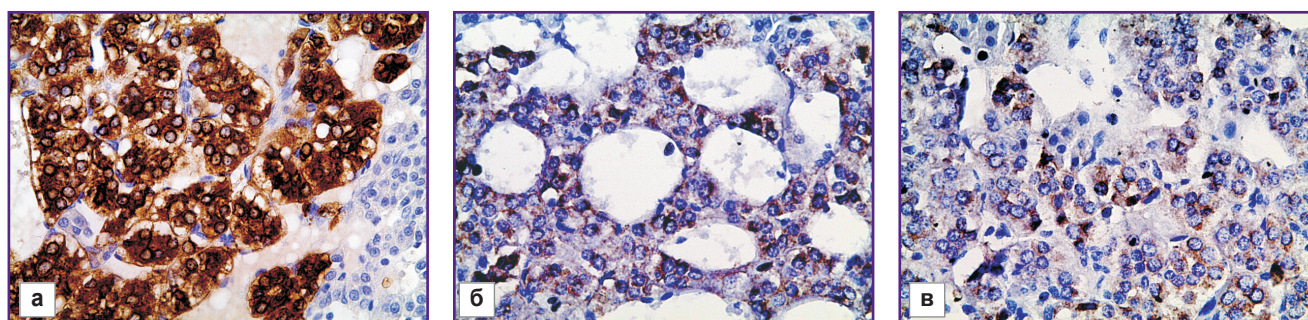


Рис. 2. Иммуногистохимическое определение ТГ в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечника крыс:

а — в контрольной группе (большинство хромаффинных клеток имеют высокое содержание ТГ в цитоплазме); б — у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах (уменьшение содержания ТГ в цитоплазме хромаффинных клеток); в — воздействие только в постнатальном периоде (большинство хромаффинных клеток не содержат ТГ); докраска гематоксилином Майера; ×400

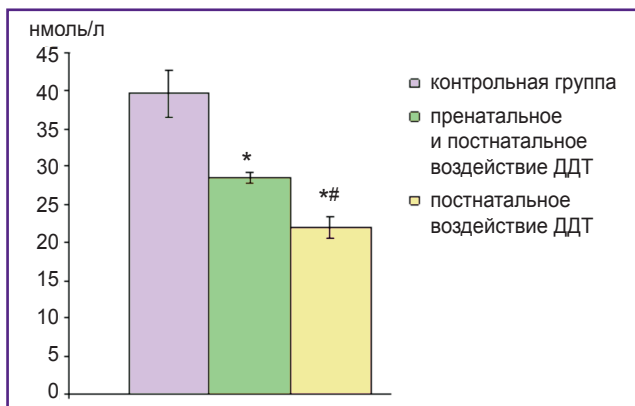


Рис. 3. Концентрация адреналина в плазме крови исследуемых крыс

* — статистически значимые отличия значений от контрольной группы, # — от значений группы «пренатальное и постнатальное воздействие ДДТ»

по сравнению и с контрольной, и с первой опытной группой (см. рис. 3).

Обсуждение

Известно, что формирование мозгового вещества надпочечников у крыс продолжается и после рождения особи, достигая своего максимального развития к постпубертатному возрасту [10, 11]. Полученные результаты показали, что пренатальное и постнатальное воздействие низких доз ДДТ в постпубертатном периоде оказывает негативное влияние на развитие и функциональную активность мозгового вещества надпочечников.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза, после достижения половой зрелости (в возрасте, когда рост надпочечника в норме завершается [10]) выявлено уменьшение размеров мозгового вещества, а также общей площади хромоафинных клеток в срезе мозгового вещества при неизменном размере этих клеток. Этот факт свидетельствует о сокращении численности хромоафинных клеток и отставании в развитии мозгового вещества в целом. Уменьшение показателей развития хромоафинной ткани в надпочечниках у крыс, подвергавшихся воздействию дизраптора, было пропорционально уменьшению продукции адреналина. Для выявления механизма нарушения синтеза этого катехоламина проведено количественное определение содержания ТГ в цитоплазме хромоафинных клеток. Поскольку имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в процессе биосинтеза катехоламинов существует только одна высокоспецифичная реакция — гидроксилирование тирозина с образованием L-ДОФА, катализируемое ТГ, то по ее активности можно судить об интенсивности синтеза катехоламинов [12, 13]. Нами было отмечено значительное

уменьшение содержания ТГ в цитоплазме хромоафинных клеток. Поскольку высокое содержание ТГ в хромоафинной клетке является признаком высокой дифференцировки, эти факты позволяют предположить, что снижение продукции гормона связано с замедлением темпов морфогенетических процессов, обусловленных действием эндокринного дизраптора в большей степени в пренатальном периоде. При этом в группе, подвергавшейся только постнатальному воздействию низких доз ДДТ, не наблюдалось столь выраженного уменьшения размеров мозгового вещества по сравнению с контролем.

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде онтогенеза, уменьшение размеров хромоафиноцитов при неизменной площади, занимаемой этими клетками в мозговом веществе, свидетельствует о компенсаторном увеличении их количества в данной опытной группе. Однако уменьшение секреции катехоламинов и увеличение количества ТГ-отрицательных клеток были значительно более выражены, чем у животных, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периодах, что может указывать на развитие компенсаторных процессов восстановления секреторной деятельности хромоафинных клеток при менее длительном потреблении ДДТ в виде увеличения числа функционально незрелых клеток.

В научной литературе имеются данные о нарушениях высшей нервной деятельности, задержке умственного развития, а также о поведенческих отклонениях, связанных с постоянным низкодозовым воздействием на организм различных эндокринных дизрапторов [2, 5, 6]. Как правило, изменение психического развития связывают с дизрапторным воздействием на функционирование щитовидной железы, с нарушением секреции тиреоидных гормонов [14, 15], а также с нарушением стероидогенной активности половых желез [16, 17]. Результаты нашего исследования дают возможность утверждать, что подобные нарушения могут быть связаны также с воздействием ДДТ на хромоафинные клетки, подавляющим секрецию катехоламинов.

Заключение

Воздействие низких доз эндокринного дизраптора ДДТ на развивающийся организм крысы нарушает формирование мозгового вещества надпочечников и цитофизиологию хромоафинных клеток. Воздействие, начавшееся в пренатальном периоде, проявляется в большей степени морфологическими изменениями мозгового вещества после достижения половой зрелости, а с начала постнатального периода — более выраженными нарушениями функционирования хромоафинных клеток. В связи с этим воздействие низких доз ДДТ можно рассматривать как потенциальный фактор риска, нарушающий функционирование нейроэндокринной системы.

Источники финансирования. Работа выполнена по государственному заданию, регистрационный номер АААА-А17-117013050048-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дизрапторы — новое направление исследований в эндокринологии. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2012; 67(3): 56–61, <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.186>.
1. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Endocrine disruptors are a novel direction of endocrinologic scientific investigation. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk* 2012; 67(3): 56–61, <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.186>.
2. Zoeller R.T., Brown T.R., Doan L.L., Gore A.C., Skakkebaek N.E., Soto A.M., Woodruff T.J., Vom Saal F.S. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology* 2012; 153(9): 4097–4110, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>.
3. Bachman M.J., Keller J.M., West K.L., Jensen B.A. Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011. *Sci Total Environ* 2014; 488–489: 115–123, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.073>.
4. World Health Organization. *Pesticide residues in food — 2016 evaluations. Part II — toxicological*. Geneva; 2017.
5. Zala S.M., Penn D.J. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Anim Behav* 2004; 68(4): 649–664, <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.01.005>.
6. Hatcher J.M., Delea K.C., Richardson J.R., Pennell K.D., Miller G.W. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites. *Neurotoxicology* 2008; 29(4): 682–690, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.010>.
7. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Effect of prenatal and postnatal exposure to low doses of DDT on catecholamine secretion in rats in different period of ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 2017; 163: 422–424. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3819-6>.
8. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В., Оберникхин С.С., Назимова С.В. Изменения секреторной деятельности адреналокитов крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2018; 3(27): 30–34, <https://doi.org/10.31088/2226-5988-2018-27-3-30-34>.
1. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V. Altered secretion of adrenomedullary A-cells in rats after developmental exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya* 2018; 3(27): 30–34, <https://doi.org/10.31088/2226-5988-2018-27-3-30-34>.
9. *Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»*. СПб: ГИОРД; 2015; 176 с.
1. *Tekhnicheskiy reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 021/2011 "O bezopasnosti pishchevoy produktsii"* [Technical regulations of the Customs Union TR CU 021/2011 "On the safety of food products"]. Saint Petersburg: GIORD; 2015. 176 p.
10. Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A.M., Ferreira J.G., Vinson G.P. Adrenarche in the rat. *J Endocrinol* 2006; 191(1): 301–308, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06972>.
11. Чумасов Е.И., Атагимов М.З., Соколов В.И., Селиверстова В.Г. Развитие хромаффинной ткани надпочечника. *Морфология* 2003; 123(3): 68–73.
1. Chumasov E.I., Atagimov M.Z., Sokolov V.I., Seliverstova V.G. The development of chromaffin adrenal gland tissue. *Morfologiya* 2003; 123(3): 68–73.
12. Grigoriev I.P., Vasilenko M.S., Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E. Use of different antibodies to tyrosine hydroxylase to study catecholaminergic systems in the mammalian brain. *Neurosci Behav Physi* 2012; 42(2): 210–213, <https://doi.org/10.1007/s11055-011-9555-x>.
13. Чумасов Е.И., Алексеенко А.Л., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Исследование нервных аппаратов сердца крыс различного возраста с помощью иммуногистохимических маркеров. *Международный вестник ветеринарии* 2017; 1: 41–46.
1. Chumasov E., Alekseenko A., Petrova E., Korzhevsky D. Study of the nervous apparatus of the heart of rats of different age by immunohistochemical markers. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii* 2017; 1: 41–46.
14. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Cytophysiological changes in the follicular epithelium of the thyroid gland after long-term exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Bull Exp Biol Med* 2017; 162: 699–702, <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3691-4>.
15. Ruuskanen S., Espín S., Sánchez-Virosta P., Sarraude T., Hsu B.Y., Pajunen P., Costa R.A., Eens M., Hargitai R., Török J., Eeva T. Transgenerational endocrine disruption: does elemental pollution affect egg or nestling thyroid hormone levels in a wild songbird? *Environ Pollut* 2019; 247: 725–735, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.088>.
16. Bornman M., Delport R., Farías P., Aneck-Hahn N., Patrick S., Millar R.P., de Jager C. Alterations in male reproductive hormones in relation to environmental DDT exposure. *Environ Int* 2018; 113: 281–289, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.039>.
17. Mhaouty-Kodja S., Naulé L., Capela D. Sexual behavior: from hormonal regulation to endocrine disruption. *Neuroendocrinology* 2019; 107(4): 400–416, <https://doi.org/10.1159/000494558>.