

ОГЛЯДИ ЛІТЕРАТУРИ

LITERATURE REVIEWS

УДК 611.43+611.018.1+576.35

О.А. Дельцова, С.Б. Герашенко, Ю.Б. Чайковський
ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Національний
медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ

У статті представлені сучасні погляди на стовбурові клітини залоз внутрішньої секреції в дорослих - гіпофіза, щитоподібної, прищитоподібної і надниркової. Мультипотентними стовбуровими клітинами/клітинами-попередницями аденогіпофіза є фолікулярно-зірчасті клітини, які експресують S100, Sox9, Sox2 і Oct4, у культурі утворюють первинні і вторинні "пітуїсфери". Клітини-попередниці пітуїцитів нейрогіпофіза за маркерами подібні до клітин-попередниць олігодендроцитів. У щитоподібній залозі дорослої людини виявлені стовбурові і клітини-попередниці ентодермального походження для тироцитів Т, які експресують ABCG2, nucleostemin і Oct4. Тироцити С експресують маркери нервової тканини (Connexin43-LacZ і Wnt1-Cre/R26R, TuJ1, нейрофіламентів160, нестин, P75NTR, і Sox10). Поверхня стовбурових клітин прищитоподібних залоз позитивна для CD73, CD166, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD44, CD105 і МНС класу I. Стовбурові клітини надниркової залози локалізуються на периферії її кори і складають 0,01-0,64% від усіх клітин субкапсулярної зони. Їхній генетичний аналіз виявив ключові сигнальні шляхи Shh і Wnt, Wnt/B-Катенін. Наводяться докази існування субпопуляції клітин-попередниць у мозковій речовині наднирника дорослих. У перспективі клітини-попередниці ендокриноцитів людини, вирощені в культурі, можуть бути використані для відновлення функцій ендокринних залоз.

Ключові слова: стовбурові клітини дорослих, ендокринні залози.

Стовбурові клітинна технологія здійснила революцію в сучасній біології і медицині і послужила основою для розуміння багатьох механізмів, контролюючих основні біологічні процеси в нормі і патогенезі хвороб.

Гіпофіз. Протягом багатьох десятиліть були використані різні підходи для дослідження стовбурових клітин (СК) гіпофіза. Узяті разом аргументи в ході давнього вивчення гіпофіза підтвердили існування СК, а також їх можливих кандидатів. Тим не менш, жодна з цих клітин не має до цього часу однозначного доказу, щоб задовольнити всі характеристики стовбурових клітин [68]. Нещодавно п'ять лабораторій повідомили про присутність у дорослих клітин-попередниць у гіпофізі і показали потенціал ендокринної диференціації, використовуючи різні методи і тести *in vitro*, маркери для їхньої очистки і характеристики. Завдяки цим дослідженням, відомості про СК і клітини-попередниці гіпофіза можна інтерпретувати у фізіології залоз, розкрити їх участь у нормальних і патологічних ситуаціях [54]. За допомогою флуоресцентно активованого сортування в передній частці гіпофіза собаки були візуалізовані та ідентифіковані СК/клітини-попередниці (1,3%), які мали маркери CD34+ і Thy1+ [71].

Нині вважають, що СК/клітинами-попередницями гіпофіза є фолікулярно-зірчасті клітини, з яких після пошкодження можуть диференціюватися ендокриноцити [31]. Історично склалося, що вивчення фолікулярно-зірчастих клітин із передньої частки гіпофіза почалося з вивчення їхніх морфологічних та електрофізіологічних характеристик, топографії, міжклітинних з'єднань цих клітин, що відіграють важливу роль у розумінні їх передбачуваних функцій [53]. Фолікулярно-зірчасті клітини в електронномікроскопічному дослідженні виглядають як ендокринні клітини без гранул. Світлова мікроскопія показала, що маркером для них є S100 білки. Цитологічні багатогранні особливості фолікулярно-зірчастих клітин підтверджують їхню можливість стати органоспецифічними СК [12,33,36]. Встановлено, що ключову роль у розвитку і регенерації гіпофіза відіграє транскрипційний фактор Pax, який є маркером ембріональних стовбурових клітин та клітин-попередниць у дорослих [51]. Цікаво, що СК/клітини-попередниці гіпофіза дорослих експресують такі самі транскрипційні фактори, які мають значення в ембріогенезі [70].

G.L. Kim et al. [44] виявили в мультипотентних СК гіпофіза людини експресію нестина, S100, Sox9 і Sox2, що підтримує гіпотезу про здатність S100(+) клітин диференціюватися в гормон-продукуючі клітини, як і в гіпофізі дорослих шурів [22,45]. Нестин-імунореактивні клітини зі спільним вираженням гладкого актина (SMA) із периваскулярного простору передньої частки гіпофіза в умовах клонування генерують первинні та вторинні скупчення у вигляді сфер. У культурі підтримується стабільна тривалість клітинного циклу з подвоєнням клітин у 10 діб протягом восьми місяців [72].

Ідентифікація ніші СК гіпофіза є важливим кроком у розумінні розвитку цього органа. Стовбурові ніші локалізуються в зоні між передньою і проміжною частками гіпофіза, тому що клітини цього регіона [10]. Клітини зі стовбурових ніш гіпофіза в гризунів і людини характеризуються експресією GFRa2, Ret ко-рецептора для Neurturin. Ці клітини також експресують B-Катенін і E-кадгерин, зумовлюючи полярність плоских клітин ніші. В інших клітинах ніші однозначно визначається фактор транскрипції Prop1, специфічний для гіпофіза, а також фактори для клітин-попередниць/СК, такі як Sox2, Sox9 і Oct4. GFRa2 + клітини у культурі утворюють ендокринні сфероїди, які можуть бути диференційовані на гормон-продукуючі клітини або нейрони з нейроектодермальним потенціалом цих попередників [27].

Клітини, що експресують Sox2 (маркер кількох раних ембріональних попередників, СК і "pituispheres" у культурі, яка може рости), утворюють вторинні сфери, і диференціюються на всі типи ендокринних клітин

гіпофіза, а також фолікулярно-зірчасті клітини. Диференціація клітин у pituispheres пов'язана з експресією нестина, Sox9 і S100. Клітини з експресією Sox2 і E-кадгерина, які виявляються в кишені Ратке в ембріонах, локалізуються в дорослій залозі, в основному, у вузькій зоні, що вистилає лійку гіпофіза, і розкидані по всьому гіпофізу. Однак, на відміну від ембріональних клітин кишені Ратке, більшість із цих Sox2(+) клітин у дорослій залозі також експресують Sox9 і S100. Автори вважають, що Sox2(+) / Sox9(+) клітини являють перехідний тип клітин, водночас як Sox2(+) / Sox9(-) клітини ототожнюються з мультипотентними СК, які знаходяться в дорослому гіпофізі [57].

У гризунів (миші) протягом першого тижня життя відбувається дозрівання гормон-продукуючих клітин. Неонатальні СК/клітини-попередниці більш активні в плані проліферації, експресії стовбурових генів і функціональної діяльності СК, включаючи формування сфер, мультипотентних потужностей диференціації та механізмів Sox2(+). Ці клітини особливо помітні на межі передньої і проміжної часток гіпофіза. Ко-локалізація Sox2 і гормонів, як правило, не спостерігається [30].

У щурів кількісний аналіз імунореактивних клітин показав, що Sox2(+) СК/клітини-попередниці гіпофіза не тільки переважно локалізовані в крайовому шарі, але й розкидані в паренхімі передньої частки. У граничних ділянках шару, кількість Prop1/Sox2(+) клітин значно зменшується до 15-го дня після народження, що вказує на значний кількісний перехід протягом першої післяпологової хвили зростання передньої частки гіпофіза [77]. Члени Sox сімейства транскрипційних факторів, ймовірно, беруть участь у самих ранніх етапах розвитку СК гіпофіза, їхній проліферації і ранньому переході до диференціації. Prop1-транскрипційний фактор і сигнальні шляхи Notch можуть регулювати перехід до диференціації [7,78].

У СК/клітинах-попередниках гіпофіза був виявлений антиген-1, пов'язаний із факторами і компонентами Notch, Wnt і Sonic Hedgehog (Shh) сигнальних шляхів [6]. При дослідженні антигену-1 у СК несподівано виявилось, що, не підмножина клітин із високим рівнем антигену-1, а, навпаки, із низьким рівнем, складає основну частину кластерів клітин-попередників гіпофіза [8].

Описані механізми виходу з циклу клітин-попередників на його початку, які критично залежать від клітинного інгібітору циклу p57Kip2, і це запобігає повторному входу в цикл диференційованих клітин, що викликає нові питання в розумінні окремих сигналів, які можуть управляти процесом диференціації і клітинного циклу [5,14].

Недавні дослідження показали, що недиференційовані СК мають імуномодуляторні властивості. Імуногістохімічними методами виявлено, що в клітинах навколо кишені Ратке локалізується інтерлейкін ІЛ-18. Із передньої частки гіпофіза бика отримані клоновані клітини, які експресували транскрипційні фактори СК/клітин-попередників – Nanog, Oct4, Ptch1, нестин, Notch1, Hes1, Lrp і Fzd4. Ці клітини швидко ростуть у культурі під впливом епідермального фактора росту і фактора росту фібробластів [52]. Крім того, ці ж клітини виявляють мРНК цитокінін, такі як ІЛ-1альфа, ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-12 і ІЛ-15. На 6-й день у культурі клітин визначили мРНК гормону росту. Ці результати переконливо показують, що СК/клітини-попередниці модулюють імуно-ендокринні функції клітин передньої частки гіпофіза через продукцію цитокінінів [54].

Однак тільки в останні роки виявили фенотипові особливості СК у гіпофізі дорослих і визначені множинні кандидати СК/клітин-попередників [21,26]. СК проліферують після народження і починають диференціюватися з утворенням клітин, які заселяють орган, натомість тих диференційованих клітин, які розвинулися з ембріональних попередників. Цим створюється мозаїка органа з двох фенотиповоподібних підмножин ендокринних клітин, які мають різне походження і різні історії життя. Ці паралельні, але окремі лінії диференційованих клітин у залозі, можуть допомогти дозріванню організму і його адаптації.

СК відіграють важливу роль у виникненні злоякісних новоутворень у деяких тканинах, а їхня роль у гіперплазії гіпофіза, гіпофізаденоми, пухлин є важливою областю для майбутніх досліджень. Із терапевтичної точки зору, можливість культивувати і вирощувати СК гіпофіза в стані “predifferentiation” також може бути корисним для довгострокового лікування недостатності гіпофіза. Уточнення властивостей і регуляції диференціації СК гіпофіза дозволить провести подальшу розробку технологій їх культивування з метою імплантації [3].

Останнім часом виявлено, що соматотропні і пролактинові ендокриноцити також мають регенеративну здатність. Відновлення пролактинових ендокриноцитів обумовлено комбінацією механізмів, включаючи набір зі СК, їх розмноження і трансдиференціювання з соматотропних ендокриноцитів [24]. Соматотропні ендокриноцити зберігають свої клітини-попередниці завдяки інсуліноподібному фактору росту-1 безпосередньо і через його сигнальні шляхи, які можуть бути залучені в підтримання працятьків [76].

У нейрогіпофізі клітини мають специфічну будову, належать до гліоцитів і отримали назву пітуїцити. У щурів клітини-попередниці пітуїцитів за маркерами ототожнюються з клітинами-попередницями олігодендроцитів. У культурі неонатальних клітин-попередників нейрогіпофіза також виділяють основні функціональні характеристики з олігодендритичними клітинами-попередницями, які одночасно мають міграційні та біпотенційні властивості і можуть диференціюватися в пітуїцити [69]. Висловлено припущення, що дорослий нейрогіпофіз може містити незрілі клітини. Для їхнього вивчення використовували аналіз формування нейросфер, щоб перевірити наявність чи відсутності СК або клітин-попередників. Дорослі клітини нейрогіпофіза можуть генерувати біпотентні первинні нейросфери, припускаючи, що структура містить гліальні попередниці, але, ймовірно, не СК [67].

Серед останніх досягнень є змодельовані в лабораторних умовах тривимірні структури зі стовбурових клітин – очний келих і гіпофіз, завдяки виявленню внутрішніх програм, які керують у локально автономних режимах процесами органогенезу і гомеостазу [61].

Щитоподібна залоза. У щитоподібній залозі дорослої людини виявлені СК і клітини–попередниці ентодермального походження [29,64]. Лише недавно стали відомими сигнали, які призводять до біохімічних та морфогенетичних подій при відновленні структур щитоподібної залози в дорослих [15].

У щитоподібній залозі мишей СК для тироцитів Т (фолікулярні клітини – продуценти три- і тетраїодтироніну) представлені двома популяціями клітин: CD45 (-) / С-комплект (-) / SCA1 (+) і CD45 (-) / С-комплект (-) / SCA1 (-) клітин. Ці клітини експресують ABCG2 і маркери генів СК, що кодують *nucleostemin* і *Ost4*, у той час як клітин з експресією генів, що кодують маркери диференціації щитоподібної залози, мало [9,32].

Для ідентифікації СК щитоподібної залози А. Fierabracci et al. [23] розробили метод на основі ферментативного розщеплення свіжої тканини щитоподібної залози, отриманої після хірургічного втручання. Клітини культивували в присутності епідермального фактора росту і фактора росту фібробластів. Були отримані сфероїди з усіх зразків щитоподібної залози. З ізольованої популяції клітин, що містили підмножини клітин CD34(+) і CD45(-), створили умови для формування фолікулів щитоподібної залози з гормональними властивостями. У клітинах тироїдних сфер від нормальної тканини, але не від ракової тканини, можна індукувати їхню подальшу диференціацію [50]. Крім того, було виявлено, що *in vitro* стимулювати генерацію клітин щитоподібної залози здатні активін, інсулін та інсуліноподібний фактор росту. СК тироцитів Т щитоподібної залози людини мають типову морфологію і характеризуються можливістю самооновлення і диференціювання. У клонованих у культурі сферах клітин щитоподібної залози, спектр експресії нагадує СК. У відповідь на тиротропний гормон (ТТГ) у сироватці ці клітини сфер диференціювалися в тироцити Т з експресією транскрипційного фактору *Rax8*, тироглобуліну, *symporter* йодиду натрію, тироїд-стимулювального рецептору гормону і тиропероксидази мРНК. Спостерігали ТТГ-залежне ¹²⁵йодиду поглинання [37].

Дослідження нормальних і ракових СК щитоподібної залози матиме важливе значення для майбутньої цільової терапії цього органа [43,46]. Нині широко обговорюється стовбурове походження раку щитовидної залози, вивчення клінічних проявів раку СК у щитоподібній залозі (найбільш поширеного раку з ендокринних залоз), досліджуються молекулярні і клітинні аспекти біології СК щитоподібної залози, що в кінцевому рахунку призведе до розуміння механізмів, що лежать в основі захворювання цього органа людини [19,28,65].

Біоінженерія м'яких тканин і органів, зокрема ендокринних залоз залишається істотною проблемою регенеративної медицини. Низка порожнистих внутрішніх органів серцево-судинної, дихальної, сечостатевої та травної систем були успішно створені біоінженерно *ex-situ*, використовуючи біосумісні сітки (каркас) із 3D морфологією, що повторює будову рідного органу (*organomorphic* сітка). Для побудови внутрішніх органів ендокринної системи необхідне створення *organomorphic* сітки, але відсутні матеріали, які здатні підтримувати зростання в діапазоні товщини регенеруючої маси клітин, і факторів для забезпечення формування повноцінної макроскопічної будови залози *ex-situ*. Існуючі технічні варіанти для реконструкції органів ендокринної системи включають або біосумісний 3D ретикулярний каркас із відсутністю будь-якої *organomorphic* геометрії, або аlogenну / ксеногенну безклітинну 3D-матрицю, отриману з заліза так само, як і для біоінженерії. У 2007 році R. Toni et al. [64], використавши біосумісні матеріали, створили *organomorphic* каркас із допомогою біореактора (пристрій для біоінженерії *ex-situ*) для щитоподібної залози людини, обраної в якості моделі через відносно просту анатомічну організацію (повторювані порожнини фолікулів). Цей пристрій відтворює 3D рідну (нативну) геометрію стромального/судинного компоненту і природний тироцити/судинний інтерфейс щитоподібної залози людини. Модель зараз інтенсивно досліджується в якості експериментального інструменту для тестування стільникового 3D автозбирання тканини щитоподібної залози і пов'язаних із її судинною системою ділянках 3D-макроскопічних структур. Автори вважають, що ці дослідження стануть основою для нової концепції в регенеративній медицині м'яких тканин і ендокринних органів, що в кінцевому підсумку призведе до фізіологічно компетентної та імунотолерантної біоконструкції, макроскопічно придатної для трансплантації та клінічного застосування [66].

Щодо тироцитів С (С-клітин, прифолікулярних клітин) відомо, що ці клітини походять із нервового гребеня [11]. Щоб перевірити цю ідею, Y. Kameda et al. [39] у трансгенних мишей використали маркери *Connexin43-LacZ* і *Wnt1-Cre/R26R*, як маркери клітин нервового гребеня. Були розглянуті також імуногістохімічні маркери, які визначають міграційні або постміграційні клітини нервового гребеня, а саме, *TuJ1*, нейрофіламентів160, нестин, *P75NTR*, і *Sox10*. Крім того, досліджена експресія Е-кадгерина (маркера епітеліальних клітин). На підставі отриманих результатів, автори зробили суперечливий висновок, що тироцити С щитоподібної залози в мишей походять з ентодермальних епітеліальних клітин четвертої глоткової кишені і не походять із нервового гребеня.

Для вивчення регенераційних можливостей щитоподібної залози Т. Ozaki et al. [55] виконали часткову тироїдектомію залози і вивчали непошкоджені ділянки та їхні проліферативні центри, де були локалізовані бромдезоксіуридин (+) та / або С клітини в мікрофолікулах. Через два тижні після операції, кількість бромдезоксіуридин(+) клітин і клітин із прозорою або слабоеозинофільною цитоплазмою помітно збільшилося в центральній ділянці. Електронномікроскопічно деякі з клітин зберегли характеристики клітин – виробників кальцитоніну (клітин С), маючи нейроендокринні гранули, тоді як інші – ознаки тироцитів Т фолікулів із мікроворсинками на апікальному полюсі. Деякі клітини були бромдезоксіуридин(+) і експресували *Foxa2* (остаточний маркер клітин ентодермального походження). Сироваткові рівні тиротропного гормону різко

змінювалися в зв'язку з тироїдектомією, викликаною гострим зменшенням генерації клітин Т4. Отримані результати свідчать, що і клітини С, і Т (фолікулярні клітини) можуть трансдиференціюватися і стати незрілими клітинами на шляху до диференціювання в клітини Т чи С і брати участь у відновленні та/або регенерації щитоподібної залози.

Прищитоподібна залоза. Клітини нормальних прищитовидних залоз, видалених з інформованої згоди пацієнтів, використали для визначення їхнього фенотипу. Після ферментативного розщеплення та вирощення первинної культури в ній з'явилися фібробластоподібні клітини, які були морфологічно однорідним населенням і їх вивчали в наступних серійних розведеннях та при клональній експансії. Каріотипування було нормальним, час подвоєння клонових клітин оцінювався в $70,7 \pm 14,5$ год (у середньому \pm стандартне відхилення). Поверхня клітин була позитивною для CD73, CD166, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD44, CD105 і МНС класу I, і негативною для CD34, CD133, CD117, Cd114, CD31, CD62P, EGF-R, ICAM-3, CD26, CXCR4, CD106, CD90 та МНС класу II. Вони були схожі на мезенхімальні стовбурові клітини. В ізольованих клітинах визначалася активність теломери разом з експресією генів плюрипотентності Sall4. Також спостерігалася експресія кальцій-чутливих рецепторів гена поряд з альфа-актином гладких м'язів і поглинання позаклітинних іонів кальцію. Крім того, прищитоподібні СК володіють остеогенним, хондрогенним і адипогенним потенціалом диференціювання [59].

Для відновлення функції ендокринних паратироцитів у перспективі можуть бути використані клітини-попередниці людини, вирощені в культурі, з їхньою подальшою диференціацією у функціонуючі паратироцити. Це край важливо при гіпопаратирозі, який є найбільш частим ускладненням хірургії щитоподібної залози. На сьогодні стабільною моделлю для вивчення диференціації в тип парашитовидних клітин є ембріональні СК людини. Раніше повідомлялося, що BG01 лінії СК стимулювали для формування ендокринних паратироцитів. Нині ця клітинна лінія більше не доступна і необхідні додаткові дослідження, щоб підтвердити і продовжити такі спостереження [74]. Автори підвищили концентрацію ембріональної телячої сироватки та своєчасного впливу активіну для виокремлення клітин лінії H1 прищитоподібного типу. Була оцінена потенційна вигода від впливу транскрипційного фактору Shh на розвиток ендокринних паратироцитів при змінах умов культивування. В якості маркерів диференційованих клітин були використані кальцій-чутливі рецептори та секреція паратироїдного гормону. У результаті проведеного дослідження отримані обнадійливі результати щодо реплікації парашитоподібних клітин і їхньої диференціації з ембріональних стовбурових клітин H1-лінії в пробірці для автотрансплантації в окремих пацієнтів.

Альтернативою вітаміну D3 і кальцію в лікуванні гіпопаратирозу можна розглядати також алотрансплантацію культури клітин прищитоподібних залоз. Є відомості про те, що у 85 пацієнтів, що перенесли алотрансплантацію культури прищитовидних СК із приводу хірургічного гіпопаратирозу, алотрансплантат діяв довгостроково. Для всіх пацієнтів тривалість виживання СК трансплантата була від 6,35 до 13,08 місяців. У 64 пацієнтів (55,1%) алотрансплантати зберегли свою ендокринну функцію більш ніж 2 місяці [53].

Для клітин-попередниць прищитовидних залоз досліджували тимус в якості джерела автологічних клітин ендодерми Клітини тимусу людини, згідно розробленого і вдосконаленого протоколу (Bingham Protocol) із використанням активіну і розчинних Shh, протягом більше 13 тижнів диференціювали і виростили клітини, які секретували паратироїдний гормон. Ці хімічно диференційовані клітини не утворювали пухлин із порушенням імунної системи в мишей. Такий підхід є ще одним кроком на шляху до стратегії відновлення функції прищитоподібних залоз за рахунок використанням автологічних клітин зі спрямуванням їхньої обробки негенетичними способами впливу [75].

Цікаво, що при гіперпаратирозі через доброякісні чи злоякісні пухлини в тканині прищитовидних залоз виявляються СК, які беруть участь у патогенезі клональної експансії клітин цієї залози [20].

Надиркова залоза. Раніше вважали, що регенерація клітин кори надиркових залоз відбувається з малодиференційованих клітин, що локалізуються між клубочковою і пучковою та клубочковою і сітчастою зонами. F. Mitani et al. [49] у щурів ділянкою між клубочковою і пучковою зонами. Водночас при вивченні проліферативної активності кори надирників у щурів із використанням імуногістохімічного методу для виявлення присутності ядерного антигену проліферуючих клітин внутрішньоядерного ферменту PCNA, синтез якого досягає максимальної інтенсивності в S-фазі клітинного циклу, встановили, що PCNA(+) клітини були ідентифіковані в клубочковій і проміжній зоні (між клубочковою і капсулою) і в капсулі. Не виключено, що ці клітини можуть бути СК, які диференціюються в кортикостероцити [56].

Нині все більше вчених схиляються до думки, що СК надиркової залози локалізуються на периферії її кори протягом усього життя і складають 0,01-0,64% від усіх клітин субкапсулярної зони і активуються під впливом екзо- чи ендогенних факторів [4,48]. Ці клітини розмножуються і деякі з них мігрують уздовж кровоносних капілярів до глибокої частини пучкової і сітчастої зон [37]. А.С. Kim, G.D. Hammer [40] визначили недиференційовані клітини кори надиркових залоз, як клітини, позбавлені експресії стероїдогенних генів, і диференційовані клітини, як клітини зі стероїдогенними потужностями.

У стовбурових нішах клітини капсули надиркової залози і субкапсулярної зони є найважливішими її компонентами. У СК генетичний аналіз виявив різні сигнальні шляхи, у тому числі Shh і Wnt в якості найважливіших медіаторів кори надиркових ліній і органного гомеостазу [34]. Експресія Shh-фактора обмежена периферійними кірковими клітинами, які виражають недостатність генів стероїдогенезу, але призводять до базових диференційованих клітин кори надиркової залози [42]. Wnt/В-Катенін сигналізація підтримує недиференційований стан і долю СК/клітин-попередниць кори надиркових залоз, зокрема, шляхом індукції його генів-мішеней Dax1 і інгібіну- α , відповідно [60,75]. Недавні дослідження показали, що експресія декількох

компонентів Wnt/В–Катенін сигналізації в корі надниркових залоз виявили ключову роль цього шляху в регуляції проліферації/диференціювання клітин-попередниць і пухлин залози [18].

Задля ідентифікації СК/клітин-попередниць кортикостероцити спробували розділити за допомогою Нільського червоного на червонояскраві і червонотьмяні, пересадити їх під капсулу і прослідкувати їх здатність до регенерації [15]. Встановлено, що серед червонотьмянних клітин містяться клітини-попередниці кортикостероцитів, які здатні розмножуватися, утворювати диференційовані дочірні клітини і можуть бути корисні для відновлення кори надниркової залози. Для виокремлення клітин-попередниць із кори надниркової залози були застосовані біофізичні методи з використанням гідродинамічних сил інерції, що, на думку авторів, дозволить заощадити кошти на молекулярні біомаркери. Флуоресцентне фарбування, поряд із вимірами експресії генів, підтвердили, що отримані й оброблені таким чином клітини залишаються життєздатними і можуть бути культивовані протягом 10 діб *in vitro*. Пропонована техніка ізоляції клітин-мішеней може забезпечити практичні засоби для збору значної кількості життєздатних клітин не тільки клітин надниркової залози, але й СК інших органів і тканин для задоволення потреб клітинної біології в регенеративній медицині [50].

В останній час представлені численні докази потенційного внеску СК/клітин-попередниць кори наднирників у патогенезі карциноми цієї залози [41].

Клітини мозкової речовини надниркової залози походять із нервового гребеня і є клітинами симпатoadреналової лінії. Існують докази існування субпопуляції компетентних клітин-попередниць у дорослому організмі. Ідентифікація симпатoadреналових клітин-попередниць у наднирковій залозі значно поглибили би розуміння фізіології цієї залози та їхньої потенційної ролі в патогенезі хвороб наднирника. Виділення і диференціація клітин-попередниць у культурі буде служити інструментом, щоб зрозуміти їх розвиток у лабораторних умовах. Крім того, завдяки тісному зв'язку з симпатичними нейронами, ці клітини можуть розширити джерело клітин для клітинної терапії нейродегенеративних захворювань. Тому дослідники прагнуть до створення протоколів для ефективної ізоляції, збагачення і диференціації хромафінних клітин-попередниць у дофамінергічних нейрони в культурі [2,17].

Література

- Allaerts W. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research / W. Allaerts, H. Vankelecom // Eur. J. Endocrinol. – 2005. – Vol. 153(1). – P. 1–12.
- Adams M.S. Review: the role of neural crest cells in the endocrine system / M.S. Adams, M. Bronner-Fraser // Endocr. Pathol. – 2009. – Vol. 20(2). – P. 92–100.
- Almeida J.P. de Pituitary stem cells: review of the literature and current understanding // J.P. de Almeida, J.H. Sherman, R. Salvatori [et al.] // Neurosurgery. – 2010. – Vol. 67(3). – P. 770–780.
- Aiba M. Alteration of subcapsular adrenocortical zonation in humans with aging: the progenitor zone predominates over the previously well-developed zona glomerulosa after 40 years of age / M. Aiba, M. Fujibayashi // – 2011. – Vol. 59(5). – P. 557–564.
- Bilodeau S. Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells / S. Bilodeau, A. Roussel-Gervais, J. Drouin // Mol. Cell Biol. – 2009. – Vol. 29(7). – P. 1895–1908.
- Chen J. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics / J. Chen, N. Hersmus, V. Van Duppen [et al.] // Endocrinology. – 2005. – Vol. 146(9). – P. 3985–3998.
- Chen J. The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population / J. Chen, A. Crabbe, V. Van Duppen [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2006. – Vol. 20(12). – P. 3293–3307.
- Chen J. Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection / J. Chen, L. Gremeaux, Q. Fu [et al.] // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27(5). – P. 1182–1195.
- Chen C.Y. Regenerative potentials of the murine thyroid in experimental autoimmune thyroiditis: role of CD24 / C.Y. Chen, H. Kimura, M.A. Landek-Salgado [et al.] // Endocrinology. – 2009. – Vol. 150(1). – P. 492–499.
- Chen C.Y. Regenerative potentials of the murine thyroid in experimental autoimmune thyroiditis: role of CD24 / C.Y. Chen, H. Kimura, M.A. Landek-Salgado [et al.] // Endocrinology. – 2009. – Vol. 150(1). – P. 492–499.
- Chen C.Y. Regenerative potentials of the murine thyroid in experimental autoimmune thyroiditis: role of CD24 / C.Y. Chen, H. Kimura, M.A. Landek-Salgado [et al.] // Endocrinology. – 2009. – Vol. 150(1). – P. 492–499.
- Castinetti F. Pituitary stem cell update and potential implications for treating hypopituitarism / F. Castinetti, S.W. Davis, T. Brue [et al.] // Endocr. Rev. – 2011. – Vol. 32(4). – P. 453–471.
- Dupin E. Neural crest progenitors and stem cells // E. Dupin, G. Calloni, C. Real [et al.] // C. R. Biol. – 2007. – Vol. 330(6–7). – P. 521–529.
- Devnath S. An insight to pituitary folliculo-stellate cells / S. Devnath, K. Inoue // J. Neuroendocrinol. – 2008. – Vol. 20(6). – P. 687–691.
- Dunn J.C. Transplantation of adrenal cortical progenitor cells enriched by Nile red / J.C. Dunn, Y. Chu, H.H. Qin [et al.] // J. Surg. Res. – 2009. – Vol. 156(2). – P. 317–324.
- Drouin J. Stem cells, differentiation and cell cycle control in pituitary / J. Drouin, S. Bilodeau, A. Roussel-Gervais // Front. Horm. Res. – 2010. – Vol. 38. – P. 15–24.
- De Felice M. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update / M. De Felice, R. Di Lauro // Endocrinology. – 2011. – Vol. 152(8). – P. 2948–2956.
- Davies T.F. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells / T.F. Davies, R. Latif, N.C. Minsky [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol. 96(9). – P. 2692–2702.
- Ehrhart-Bornstein M. Chromaffin progenitor cells from the adrenal medulla / M. Ehrhart-Bornstein, V. Vukicevic, K.F. Chung [et al.] // Cell Mol. Neurobiol. – 2010. – Vol. 30(8). – P. 1417–1423.
- El Wakil A. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer / A. El Wakil, T. Lalli // Mol. Cell Endocrinol. – 2011. – Vol. 332(1–2). – P. 32–37.
- Fierabracci A. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid / A. Fierabracci, M.A. Puglisi, L. Giuliani [et al.] // J. Endocrinol. – 2008. – Vol. 198(3). – P. 471–487.
- Fang S.H. Expansion of a cell population expressing stem cell markers in parathyroid glands from patients with hyperparathyroidism / S.H. Fang, J.A. Guidroz, Y. O'Malley [et al.] // Ann. Surg. – 2010. – Vol. 251(1). – P. 107–113.
- Florio T. Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development / T. Florio // Neuroendocrinology. – 2011. – Vol. 94(4). – P. 265–277.

24. Fu Q. The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration // Q. Fu, L. Gremeaux, R.M. Luque [et al.] // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153(7). – P. 3224–3235.
25. Fierabracci A. Identifying thyroid stem/progenitor cells: advances and limitations / A. Fierabracci // *J. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 213(1). – P. 1–13.
26. Fu Q. Regenerative Capacity of the Adult Pituitary: Multiple Mechanisms of Lactotrope Restoration After Transgenic Ablation / Q. Fu, H. Vankelecom H. // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol. 21(18). – P. 3245–3257.
27. Gleiberman A.S. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells / A.S. Gleiberman, T. Michurina, J.M. Encinas [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105(17). – P. 6332–6337.
28. Gholamrezaezhad A. Is there any benefit in generating thyrocytes from stem cells? / A. Gholamrezaezhad, S. Mirpour, S. Kolahdoozan // *Polish J. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 60 (5). – P. 422–423.
29. Gibelli B. Thyroid stem cells—danger or resource? / B. Gibelli, A. El-Fattah, G. Giugliano [et al.] // *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* – 2009. – Vol. 29(6). – P. 290–295.
30. Garcia-Lavandeira M. A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary / M. Garcia-Lavandeira, V. Quereda, I. Flores [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4(3). – 4815 p.
31. Gremeaux L. Activated phenotype of the pituitary stem/progenitor cell compartment during the early–postnatal maturation phase of the gland / L. Gremeaux, Q. Fu, J. Chen [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol. 21(5). – P. 801–813.
32. Horvath E. Folliculo–stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? / E. Horvath, K. Kovacs K. // *Ultrastruct Pathol.* – 2002. – Vol. 26(4). – P. 219–228.
33. Hoshi N. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell–like characteristics / N. Hoshi, T. Kusakabe, B.J. Taylor [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148(9). – P. 4251–4258.
34. Horvath E. Folliculo–stellate cells of the human pituitary as adult stem cells: examples of their neoplastic potential / E. Horvath, C.I. Coire, K. Kovacs [et al.] // *Ultrastruct. Pathol.* – 2010. – Vol. 34(3). – P. 133–139.
35. Huang C.C. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog / C.C. Huang, S. Miyagawa, D. Matsumaru [et al.] // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151(3). – P. 1119–1128.
36. Hur S.C. Label–free enrichment of adrenal cortical progenitor cells using inertial microfluidics / S.C. Hur, T.Z. Brinckerhoff, C.M. Walthers [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(10). – 46550 p.
37. Inoue K. Are folliculo–stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cell or organ–specific stem cells? / K. Inoue, C. Mogi, S. Ogawa [et al.] // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2002. – Vol. 110(1–2). – P. 50–53.
38. Kashirina N.K. The morphological and functional basis of the new conception about the suprarenal cortex regeneration / N.K. Kashirina // *Medicina (Kaunas)*. – 2003. – Vol. 39(10). – P. 951–954.
39. Kameda Y. Expression of the epithelial marker E–cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development // Y. Kameda, T. Nishimaki, O. Chisaka [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2007. – Vol. 55(10). – P. 1075–1088.
40. Kim A.C. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances / A.C. Kim, G.D. Hammer // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2007. – Vol. 265–266. – P. 10–16.
41. Kim A.C. In search of adrenocortical stem and progenitor cells / A.C. Kim, F.M. Barlaskar, J.H. Heaton [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2009. – Vol. 30(3). – P. 241–263.
42. King P. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages / P. King, A. Paul, E. Laufer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(50). – P. 21185–21190.
43. Klonisch T. Thyroid stem cells and cancer / T. Klonisch, C. Hoang–Vu, S. Hombach–Klonisch // *Thyroid*. – 2009. – Vol. 19(12). – P. 1303–1315.
44. Kim G.L. Generation of immortal cell lines from the adult pituitary: role of cAMP on differentiation of SOX2–expressing progenitor cells to mature gonadotropes / G.L. Kim, X. Wang, J.A. Chalmers [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6(11). – 27799 p.
45. Kikuchi M. Immunohistochemical localization of anterior pituitary hormones in S–100 protein–positive cells in the rat pituitary gland / M. Kikuchi, M. Yatabe, Y. Tando [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 345(3). – P. 425–429.
46. Lin R.Y. New insights into thyroid stem cells / R.Y. Lin // *Thyroid*. – 2007. – Vol. 17(10). – P. 1019–1023.
47. Lan L. Isolation, proliferation and differentiation of thyroid stem cell from human thyroid nodule tissue / L. Lan, D. Cui, B.Y. Shi [et al.] // *Zhonghua Yi. Xue. Za. Zhi.* – 2012. – Vol. 92(12). – P. 806–810.
48. Lichtenauer U.D. The side population phenomenon enriches for designated adrenocortical progenitor cells in mice / U.D. Lichtenauer, I. Shapiro, S. Sackmann [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 215(3). – P. 383–391.
49. Mitani F. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex / F. Mitani, K. Mukai, H. Miyamoto [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – Vol. 1619(3). – P. 317–324.
50. Malaguarrera R. Insulin receptor isoforms and insulin–like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid / R. Malaguarrera, F. Frasca, A. Garozzo [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 96(3). – P. 766–774.
51. Muranishi Y. An essential role for Rax in retina and neuroendocrine system development / Y. Muranishi, K. Terada, T. Furukawa // *Dev. Growth Differ.* – 2012. – Vol. 54(3). – P. 341–348.
52. Norlin S. Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary / S. Norlin, U. Nordström, T. Edlund // *Mech. Dev.* – 2000. – Vol. 96(2). – P. 175–182.
53. Nawrot I. Allograft transplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results / I. Nawrot, B. Woźniewicz, T. Tołłoczko [et al.] // *Transplantation*. – 2007. – Vol. 83(6). – P. 734–740.
54. Nagai Y. Bovine anterior pituitary progenitor cell line expresses interleukin (IL)–18 and IL–18 receptor / Y. Nagai, H. Ogasawara, Y. Taketa [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* – 2008. – Vol. 20(11). – P. 1233–1241.
55. Ozaki T. Thyroid regeneration: characterization of clear cells after partial thyroidectomy / T. Ozaki, T. Matsubara, D. Seo [et al.] // *Endocrinology*. – 2012. – Vol. 153(5). – P. 2514–2525.
56. Pignatelli D. Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex / D. Pignatelli, J. Ferreira, P. Vendeira [et al.] // *Endocr. Res.* – 2002. – Vol. 28(4). – P. 683–691.
57. Rizzoti K. SOX2–expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland / K. Rizzoti, M. Dattani, R. Lovell–Badge [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2008. – Vol. 105(8). – P. 2907–2912.
58. Rizzoti K. Adult pituitary progenitors/stem cells: from in vitro characterization to in vivo function / K. Rizzoti // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32(12). – P. 2053–2062.
59. Shih Y.R. Shih Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland // Y.R. Shih, T.K. Kuo, A.H. Yang [et al.] // *Cell Prolif.* – 2009. – Vol. 42(4). – P. 461–470.
60. Simon D.P. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma / D.P. Simon, G.D. Hammer // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2012. – Vol. 351(1). – P. 2–11.
61. Sasai Y. In vitro organogenesis in three dimensions: self–organising stem cells / Y. Sasai, M. Eiraku, H. Suga // *Development*. – 2012. – Vol. 139(22). – P. 4111–4121.
62. Thomas T. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands / T. Thomas, K. Nowka, L. Lan [et al.] // *Thyroid*. – 2006. – Vol. 16(6). – P. 537–544.
63. Thomas D. Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer / D. Thomas, S. Friedman, R.Y. Lin // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2008. – Vol. 15(1). – P. 51–58.

64. Toni R. Ex situ bioengineering of bioartificial endocrine glands: a new frontier in regenerative medicine of soft tissue organs / R. Toni, A. Tampieri, N. Zini [et al.] // *Ann. Anat.* – 2011. – Vol. 193(5). – P. 381–394.
65. Virard I. Oligodendrocyte precursor cells generate pituitocytes in vivo during neurohypophysis development / I. Virard, D. Coquillat, M. Bancila [et al.] // *Glia.* – 2006. – Vol. 53(3). – P. 294–303.
66. Vankelecom H. Stem cells in the postnatal pituitary? / H. Vankelecom // *Neuroendocrinology.* – 2007. – Vol. 85(2). – P. 110–130.
67. Virard I. Characterization of heterogeneous glial cell populations involved in dehydration-induced proliferation in the adult rat neurohypophysis / I. Virard, O. Gubkina, F. Alfonsi [et al.] // *Neuroscience.* – 2008. – Vol. 151(1). – P. 82–91.
68. Vankelecom H. Pituitary stem/progenitor cells: embryonic players in the adult gland? / H. Vankelecom // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32(12). P. 2063–2081.
69. van Rijn S.J. Identification and characterisation of side population cells in the canine pituitary gland / S.J. van Rijn, L. Gremeaux, F.M. Riemers [et al.] // *Vet. J.* – 2012. – Vol. 192(3). – P. 476–482.
70. Weiss S. Evidence for a progenitor cell population in the human pituitary / S. Weiss, F.A. Siebzehnrübl, J. Kreutzer [et al.] // *Clin. Neuropathol.* – 2009. – Vol. 28(4). – P. 309–318.
71. Woods Ignatoski K.M. Differentiation of precursors into parathyroid-like cells for treatment of hypoparathyroidism / K.M. Woods Ignatoski, E.L. Bingham, L.K. Frome [et al.] // *Surgery.* – 2010. – Vol. 148(6). – P. 1186–1190.
72. Woods Ignatoski K.M. Directed trans-differentiation of thymus cells into parathyroid-like cells without genetic manipulation // K.M. Woods Ignatoski, E.L. Bingham, L.K. Frome [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2011. – Vol. 17(11). – P. 1051–1059.
73. Wood M.A. Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins / M.A. Wood, G.D. Hammer // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2011. – Vol. 336(1–2). – P. 206–212.
74. Yokoyama K. Somatotropes maintain their immature cells through Insulin-like growth factor I (IGF-I) / K. Yokoyama, C. Mogi, K. Miura [et al.] // *Endocr. Pathol.* – 2007. – Vol. 18(3). – P. 174–181.
75. Yoshida S. Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary / S. Yoshida, T. Kato, H. Yako [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* – 2011. – Vol. 23(10). – P. 933–943.
76. Zhu X. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis // X. Zhu, J. Zhang, J. Tollkuhn [et al.] // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20(19). – P. 2739–2753.

Реферати

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ

Дельцова Е.И., Герашенко С.Б., Чайковский Ю.Б.

В статье представлены современные взгляды на стволовые клетки желез внутренней секреции у взрослых - гипофиза, щитовидной, паращитовидной и надпочечника. Мультипотентными стволовыми клетками/клетками-предшественницами аденогипофиза являются фолликулярно-звездчатые клетки, которые экспрессируют S100, Sox9, Sox2 и Oct4, в культуре образуют первичные и вторичные "питуисферы". Клетки-предшественницы питуицитов нейрогипофиза по маркерам схожи с клетками-предшественницами олигодендроцитов. В щитовидной железе взрослого человека выявлены стволовые и клетки-предшественницы энтодермального происхождения для тироцитов Т, экспрессирующие ABCG2, nucleostemin и Oct4. Тироциты С экспрессируют маркеры нервной ткани (Connexin43-LacZ, Wnt1-Cre/R26R, TuJ1, нейрофиламентов160, нестин, P75NTRi и Sox10). Поверхность стволовых клеток околощитовидных желез положительна для CD73, CD166, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD44, CD105 и МНС класса I. Стволовые клетки надпочечной железы локализируются на периферии ее коры и составляют 0,01-0,64% всех клеток субкапсулярной зоны. Их генетический анализ выявил ключевые сигнальные пути Shh и Wnt, Wnt/B-Катенин. Приводятся доказательства существования субпопуляции клеток-предшественниц в мозговом веществе надпочечника взрослых. В перспективе клетки-предшественницы эндокриноцитов человека, выращенные в культуре, могут быть использованы для восстановления функций эндокринных желез.

Ключевые слова: стволовые клетки взрослых, эндокринные железы.

Статья надійшла 1.05.2013 р.

STEM CELLS OF ENDOCRINE GLANDS

Deltsova O.I., Geraschenko S.B., Chaikovsky Yu.B.

The article presents current views on stem cells of endocrine glands in adults - pituitary, thyroid, parathyroid, and adrenal gland. Multipotent stem/progenitor cells of adenohypophysis are follicular stellate cells which express the S100, Sox9, Sox2 and Oct4, in culture form the primary and secondary "pituisspheres". Pituitary progenitor cells of neurohypophysis by markers resemble oligodendrocyte progenitor cells. In the thyroid gland of adults stem cells and progenitor cells of endodermal origin for T-thyocytes are identified. They express ABCG2, nucleostemin and Oct4. C-thyocytes express markers of neural tissue (Connexin43-LacZ, Wnt1-Cre/R26R, TuJ1, neurofilaments160, nestin, P75NTRi and Sox10). The surface of stem cells in parathyroid glands is positive for CD73, CD166, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD44, CD105 and MHC class I. Stem cells of adrenal gland are localized in its cortex periphery and compose 0,01-0,64% of all cells in subcapsular zone. Their genetic analysis identified key signaling pathways Shh and Wnt, Wnt/B-Catenin. Evidence of progenitor cells subpopulation in the adrenal medulla of adults is presented. In perspective grown in culture endocrine progenitor cells of humans can be used to restore functions of endocrine glands.

Key words: stem cells of adults, endocrine glands.