

А.В. Абрамов, Н.Л. Колычева, Ю.М. Колесник

Особенности синтеза белка *c-Fos* и катехоламинов эндокриноцитами мозгового вещества надпочечных желез при сахарном диабете

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: ген *c-fos* • катехоламины • надпочечные железы • сахарный диабет

В эксперименте изучены особенности синтеза РНК, катехоламинов и белка *c-Fos* эндокриноцитами мозгового вещества надпочечников крыс в начальных стадиях развития стрептозоточин-индуцируемого диабета. Показано, что острая гипогликемия в первые сутки после индукции диабета приводит к увеличению численности эндокриноцитов, повышению в них концентрации РНК и катехоламинов. В дальнейшем наблюдается фазная динамика концентрации биогенных аминов с доминированием содержания адреналина в пуле катехоламинов, отрицательно коррелирующим ($r = -0,82$) с уровнем гликемии. Установлена отрицательная корреляционная зависимость между содержанием адреналина и плотностью с *Fos*-иммунопозитивных эндокриноцитов ($r = -0,99$) при диабете и концентрацией белка *c-Fos* в клетках ($r = -0,8$).

Особливості синтезу білку *c-Fos* та катехоламінів эндокриноцитами мозкового шару надниркових залоз при цукровому діабеті

А.В. Абрамов, Н.Л. Колычева, Ю.М. Колесник

В експерименті вивчені особливості синтезу РНК, катехоламінів та білку *c-Fos* эндокриноцитами мозкового шару надниркових залоз щурів на початкових стадіях розвитку стрептозоточин - індукованого діабету. Показано, що гостра гіпоглікемія на першу добу після індукції діабету призводить до збільшення кількості ендокриноцитів, підвищення в них концентрації РНК та катехоламінів. У подальшому спостерігається фазна динаміка концентрації біогенних амінів з домінуванням вмісту адреналіну в пулі катехоламінів, що негативно корелірує ($r = -0,82$) з рівнем глікемії. Встановлена негативна кореляційна залежність між вмістом адреналіну та щільністю *c-Fos* - імунопозитивних ендокриноцитів ($r = -0,99$) при діабеті, та концентрацією білку *c-Fos* у клітинах ($r = -0,8$).

Ключові слова: ген *c-fos* • катехоламіни • надниркові залози • цукровий діабет**Патологія.** – 2008. – Т. 5, №1. – С. 68-71

Peculiarities of *c-Fos* and catecholamines synthesis with endocrinocytes of adrenal medulla in diabetes mellitus

A.V. Abramov, N.L. Kolycheva, Yu.M. Kolesnik

The experiment studies the peculiarities of RNA, catecholamines and protein synthesis with *c-Fos* endocrinocytes of adrenal medulla for rats at early stages of development of streptozotocin-induced diabetes. It was revealed that acute hypoglycemia for the first 24 hours after inducing diabetes resulted in the increase in endocrinocytes number and rise of RNA and catecholamines concentration in them. Subsequently we could observe the phase dynamics of biogenic amines concentration with dominating content of adrenalin in catecholamine pool. The negative correlative dependence has been identified between the content of adrenaline and the density of *c-Fos* - immunopositive endocrinocytes ($r = 0,99$) in diabetes and between the level of *c-Fos* protein concentration in cells ($r = 0,8$).

Key words: *c-fos* gene • catecholamines • suprarenal glands • diabetes mellitus**Pathologia.** 2008;5(1):68-71

Введение

Среди путей и механизмов регуляции эндокринной функции поджелудочной железы на современном этапе большое значение придается участию нейроэндокринной системы в этом процессе. В частности, показана роль гипоталамических нейропептидов в модуляции синтеза и секреции инсулина в норме и при развитии экспериментального сахарного диабета [1,2]. Вместе с тем, нет однозначных данных о роли катехоламинергической системы надпочечных желез в патогенезе диабета, хотя гипергликемическая направленность эффектов катехоламинов хорошо известна. Роль надпочечников в организме чрезвычайно велика: именно они обеспечивают адаптацию к острому и хроническому стрессу различного генеза, реагируя

на стрессорные воздействия усилением синтеза и секреции катехоламинов [3,4,5]. Одним из ранних маркеров активации эндокринных клеток является белок *c-Fos* – продукт активации ядерного протоонкогена *c-fos*, относящегося к так называемым генам "раннего реагирования". Этот протоонкоген представляет собой одну из основных ядерных мишеней для передачи сигналов регуляции клеточного роста и трансформации и вовлечен во множество клеточных функций, в том числе в процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [6,7]. Протоонкоген *c-fos* достаточно быстро, но кратковременно, активируется в ответ на воздействия самого широкого спектра [8] и затем выступает как регулятор "поздних генов" регуляции клеточного роста [9].

Цель работы – изучение молекулярных маркеров функционального состояния эндокриноцитов мозгового вещества надпочечных желез в динамике развития сахарного диабета у крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 60 самцах белых лабораторных крыс. Сахарный диабет моделировали однократным внутривенным введением стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 50 мг/кг. Интактных самцов использовали в качестве контроля. Животные имели свободный доступ к пище и воде, а в первые сутки после индукции диабета воду заменяли на 20% раствор сахарозы. Уровень глюкозы определяли в венозной крови глюкозооксидазным методом. Животных выводили из эксперимента декапитацией под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), надпочечные железы немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна на 24 часа или замораживали в жидком азоте.

Фиксированные надпочечники после стандартной гистологической проводки железы заливали в парафиновые блоки, из которых на ротационном микротоме MICROM HR360 (Германия) готовили серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Для выявления РНК срезы депарафинировали, регидрировали в нисходящих концентрациях этанола и окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону [10]. Для выявления белка *c-Fos* в клетках мозгового вещества надпочечников срезы депарафинировали, регидрировали в нисходящих концентрациях этанола, отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4), 24 часа инкубировали (Т=4°C) с мышинными IgG к белку *c-Fos* крысы (Sigma, США), а затем 1 час (Т=37°C) с кроличьими антителами к IgG мыши, конъюгированными с FITC (Sigma, США). Анализ гистологических срезов проводили на системе цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия) на базе люминесцентного микроскопа AXIOSKOP (Zeiss, Германия). В плоскости среза мозгового вещества надпочечников определяли плотность эндокриноцитов

(мм²) и концентрацию в них РНК (в миллиединицах оптической плотности, мЕ_{оп}). Иммунофлюоресценцию получали с помощью фильтров возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм и измеряли площадь материала, иммунореактивного к *c-Fos* (мкм²), концентрацию белка *c-Fos* в эндокриноцитах (в единицах иммунофлюоресценции – Е_{иф}), плотность *c-Fos*-иммунопозитивных клеток (%).

Замороженные в азоте надпочечники гомогенизировали и оценивали концентрацию адреналина и норадреналина флюорометрически по запатентованной авторами методике [11].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической *t* статистикой Стьюдента и непараметрической *U*-статистикой Вилкоксона-Манна-Уитни, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $P_{ST} < 0,05$ или $P_U < 0,05$, соответственно.

Результаты и их обсуждение

Введение стрептозотоцина для индукции диабета приводит к массовой гибели бета-клеток панкреатических островков и высвобождению из них инсулина, что приводит к выраженной гипогликемии в первые сутки (табл. 1), несмотря на то, что животные в этот день получали для питья 20% раствор сахарозы. Острую гипогликемию следует рассматривать как стрессорный фактор, и поэтому вполне ожидаемой была реакция катехоламинергической системы надпочечников. Так, в первые сутки развития диабета в ткани надпочечников увеличивалось содержание адреналина на 32,7% ($P_{ST} < 0,05$) при снижении концентрации норадреналина на 14% ($P_{ST} < 0,05$). При этом адреналин/норадреналиновый коэффициент достоверно увеличивался в пользу адреналина.

Известно, что в медуллярной зоне надпочечников у крыс преобладает содержание норадреналина [12]. Учитывая биохимический цикл синтеза катехоламинов, полученные результаты свидетельствовали об усилении ферментозависимой конверсии норадреналина в конечный продукт – адреналин, при этом сум-

Таблица 1. Характеристика медуллярной зоны надпочечников крыс с экспериментальным диабетом (M±m)

Показатели	Интактные крысы	Диабет			
		1 сутки	3 сутки	7 сутки	10 сутки
Глюкоза плазмы, мМ/л	3,65±0,08	2,53±0,12*	9,27±0,35*	7,10±0,23*	7,86±0,26*
Плотность эндокриноцитов, мм ⁻²	6594±136	7190±145 *	7180±100*	7189±118*	7164±88*
Концентрация РНК, мЕ _{оп}	221±1	649±9*	458±3*	329±3*	328±3*
Плотность <i>c-Fos</i> -иммунопозитивных эндокриноцитов, %	3,78±0,15	2,04±0,18*	3,59±0,20	3,53±0,15*	2,67±0,15*
Концентрация <i>c-Fos</i> в эндокриноцитах Е _{иф}	1,63±0,07	0,61±0,01*	0,93±0,02*	0,75±0,01*	0,68±0,01*
Концентрация адреналина, нМ/г	115,8±6,7	153,7±4,1*	102,8±4,2	99,3±2,7*	129,2±2,9
Концентрация норадреналина, нМ/г	133,8±8,7	115,2±3,8*	108,4±4,8*	83,5±2,5*	116,9±3,6
Коэффициент адреналин/норадреналин	0,87±0,03	1,34±0,03*	0,95±0,01*	1,19±0,04*	1,11±0,02*

* - достоверные изменения (PST < 0,05) по отношению к контролю

марное содержание моноаминов в надпочечниках через сутки после индукции диабета практически не изменялось ($P_U > 0,05$). Подобная реакция характерна для острой гипогликемии, вызванной инфузией инсулина, и отражает усиление синтеза катехоламинов в мозговом слое надпочечников с последующим их поступлением в кровоток [13]. Это, в свою очередь, происходит при увеличении синтеза ключевых ферментов синтеза моноаминов, что предположительно подтверждается увеличением примерно в 3 раза концентрации РНК в эндокриноцитах. Свидетельством повышения активности мозгового слоя надпочечников было также увеличение численности эндокриноцитов на 9% ($P_{ST} < 0,05$) через сутки после индукции диабета. Ранее было показано, что эндокриноциты медуллярной зоны обладают выраженной пролиферативной активностью и у интактных крыс 40% клеток обновляются примерно за 70 дней [14]. Это объясняет способность медуллярной зоны надпочечников к быстрому увеличению клеточной популяции после стимуляции, в роли которой в нашем случае выступает гипоинсулинемия. Вместе с тем, количество *c-Fos*-иммунопозитивных клеток в мозговом слое надпочечников через сутки после индукции диабета снижалось на 46% ($P_{ST} < 0,05$) в сочетании с уменьшением в них концентрации белка *c-Fos* более чем в 2,5 раза ($P_{ST} < 0,05$). Казалось бы, что данный факт противоречит ранее приведенным данным о повышении функциональной активности эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечников. Однако, здесь следует принимать во внимание кратковременность активации гена *c-fos*, следующую непосредственно за стрессом, а также характер самого стресса [4,8]. Так, в эксперименте показано достоверное увеличение концентрации белка *c-Fos* в надпочечниках через 2 часа после электрического шока [15], через 24 часа после 2-часовой иммобилизации [15] и травматического шока [4], а хронический иммобилизационный стресс повышал экспрессию гена *c-fos* только через 4 недели [3], но не в первые 1-2 недели [3,15]. В наших исследованиях определение белка *c-Fos* проводилось через 24 часа после стрептозотоцин-индуцируемой гиперинсулинемии и вполне возможно, что выраженность экспрессии гена *c-fos* была не столь выраженной, как это имеет место при жесткой иммобилизации или травме. Мы полагаем, что определение белка *c-Fos* в первые 4-6 часов после введения стрептозотоцина должно выявить достоверное увеличение количества *c-Fos*-иммунопозитивных клеток, поскольку увеличение плотности эндокриноцитов в медуллярной зоне надпочечников и повышение концентрации РНК через 24 часа в нашем эксперименте является очевидным результатом активации клеточного генома.

Дальнейшее развитие патологического процесса с 3-х по 10-е сутки после индукции диабета сопровождалось повышением концентрации глюкозы в крови более 7,0 мм/л с ранним пиком гипергликемии на

3-и сутки. Это соответствует данным о гликемическом профиле крыс со стрептозотоцин-индуцируемым диабетом [16]. Анализ функционального состояния медуллярной зоны надпочечников в этот период показал, что плотность эндокриноцитов сохранялась на 8,5-9% выше ($P_{ST} < 0,05$), чем у интактных крыс. При этом концентрация РНК в клетках постепенно снижалась и к 10-м суткам становилась примерно в 2 раза ниже, чем в первые сутки после индукции диабета. В надпочечниках уменьшалось депо катехоламинов, и к 7-м суткам концентрация адреналина снижалась на 14,2% ($P_{ST} < 0,05$), а норадреналина – на 37,6% ($P_{ST} < 0,05$), по сравнению с интактными животными. Это свидетельствовало о постепенном снижении процессов биосинтеза в эндокриноцитах медуллярной зоны надпочечников и характеризовалось отрицательной корреляционной зависимостью между уровнем гликемии и концентрацией адреналина ($r = -0,82$) в надпочечниках. Вместе с тем, к 10-м суткам течения диабета концентрация катехоламинов, в том числе и суммарный показатель их содержания, соответствовали уровню интактных крыс ($P_{ST} > 0,05$, $P_U > 0,05$). Сходные данные ранее отмечали у половозрелых крыс линии ВВ с генетическим диабетом, у которых не выявили существенных отличий в содержании катехоламинов надпочечников по сравнению с интактными крысами линии Вистар [17]. Однако, наши данные свидетельствуют об изменении метаболизма катехоламинов в надпочечниках при диабете в сторону преобладания синтеза адреналина, по сравнению с образованием норадреналина у интактных крыс.

Обращало внимание, что если к 3-м суткам развития диабета численность *c-Fos*-иммунопозитивных эндокриноцитов восстанавливалась до уровня интактных крыс, то к 10-м суткам этот показатель уменьшался. При этом концентрация белка *c-Fos* оставалась на 43-58% ниже, чем у интактных животных, и хорошо коррелировала ($r = +0,86$) с изменением количества иммунопозитивных клеток и с уровнем гликемии ($r = +0,80$). Следует также отметить высокую негативную корреляцию между концентрацией адреналина в надпочечниках и плотностью *c-Fos*-иммунопозитивных эндокриноцитов ($r = -0,99$), а также концентрацией белка *c-Fos* в клетках ($r = -0,80$) в динамике развития диабета. На наш взгляд, подобная корреляционная зависимость является подтверждением *c-Fos*-опосредованной регуляции биосинтеза катехоламинов в надпочечниках при сахарном диабете, наряду с проанализированными выше изменениями плотности эндокриноцитов и концентрации клеточной РНК.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют четкую тенденцию к уменьшению эндокринной функции мозгового вещества надпочечников в ответ на формирование диабетической гипергликемии, что, по-видимому, отражает компенсаторную реакцию хромоаффинной ткани, на-

правленную на ограничение гипергликемического действия катехоламинов. Несмотря на то, что между уровнем гликемии и плотностью c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов в медулярной зоне надпочечников выявлялась высокая корреляционная связь ($r = +0,86$), характер накопления белка c-Fos в динамике развития экспериментального сахарного диабета позволяет высказать предположение, что регуляция гликемии с участием катехоламинов скорее всего является вспомогательным, но не основным механизмом общего нейроэндокринного ответа на системное нарушение углеводного гомеостаза в начальных стадиях развития диабета.

Выводы

1. Острая гипогликемия, обусловленная стрептозотоцин-индуцируемой гибелью бета-клеток и гиперинсулинемией, приводит к увеличению численности эндокриноцитов мозгового слоя надпочечных желез, повышению в них концентрации РНК и синтеза катехоламинов.

2. Начальный период развития экспериментального диабета сопровождается фазной динамикой изменения концентрации биогенных аминов в надпочечниках с доминированием содержания адреналина в пуле катехоламинов, отрицательно коррелирующим ($r = -0,82$) с уровнем гликемии.

3. Динамика содержания адреналина в надпочечниках при диабете характеризуется обратной корреляционной зависимостью с численностью c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов ($r = -0,99$) и концентрацией в них белка c-Fos ($r = -0,8$).

Литература

1. Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Василенко Г.В., Жулинский В.А. Участие различных отделов гипоталамуса в патогенезе экспериментального сахарного диабета у крыс // Пробл. эндокринологии.- 1995.- Т.39, №5.- С.34-37.
2. Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Жулинский В.А., с соавт. Коррекция иммуно-эндокринных нарушений при экспериментальном сахарном диабете введением гипоталамических нейропептидов // Клин. эксперим. патология.- 2004.- №2, ч.1.- С.120-123.
3. Roske I., Hughes M.E., Newson P. et al. Effect of chronic intermittent immobilization stress on Fos-like immunoreactivity in rat brain and adrenal medulla // Stress.- 2002, Vol. 4, No.5.- P.277-283.

4. Sabban E.L., Hebert M.A., Liu X., Nankova B., Serova L. Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems // Ann. N.-Y. Acad. Sci.- 2004.- Vol.1032.- P.130-140.
5. Пшенникова М.Г., Попкова Е.В., Бондаренко А.Н. с соавт. Катехоламины, оксид азота и устойчивость к стрессорным повреждениям: влияние адаптации к гипоксии // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова.- 2002.- Т.88, №4.- С.485-494.
6. Ohkubo Y., Arima M., Okada S. A role for c-fos activator protein-1 in B- lymphocyte terminal differentiation // J.Immunology.- 2005.- Vol.174.- P.585-594.
7. Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation // Histol. Histopathol.- 2000.- Vol.15.- P.921-928.
8. Janknecht R. Regulation of the c-fos promoter // J.Immunobiology.- 1995.- Vol.193.- P.137-140.
9. Анохин К. В. Психофизиология и молекулярная генетика мозга / Основы психофизиологии. Под. ред. Ю.И.Александрова.- СПб., 2001.
10. Пирс Э. Гистохимия.- М.: "Изд-во ин. лит."- 1962.- 962с.
11. Патент України № 11450, G01N33/48. Спосіб визначення адреналіну та норадреналіну в одній пробі біологічного матеріалу / Колесник Ю.М., Бленічев І.Ф., Абрамов А.В., та співавтор. // Дата видачі 15.12.2005. Опубл.- 2005.- №12.
12. Role L.W., Perlman R.L. Catecholamine uptake into isolated adrenal chromaffin cells: inhibition of uptake by acetylcholine // Neuroscience.- 1983.- Vol.10.- P.987-996.
13. Vommer R.R., Balcita-Pedicino J.J., Debnam A.J., Edwards DJ. Adrenal medullary catecholamine secretion patterns in rats eroded by reflex and direct neural stimulation // Clin. Exp. Hypertens.- 2000.- Vol.22, 7-8.- P.705-715.
14. Verhofstad A.A.J. Kinetics of adrenal medullary cells // J. Anat.- 1993.- Vol.183.- P.315-326.
15. Nankova B.B., Rivkin M., Kelz M., et al. Fos-related antigen 2: Potential mediator of the transcriptional activation in rat adrenal medulla evoked by repeated immobilization stress // J. Neurosci.- 2000.- Vol.20, No.15.- P.5647-5653.
16. Орловский М.А. Закономерности формирования гипергликемии при экспериментальном сахарном диабете // Патология.- 2004.- Т.1, №1.- С.52-56.
17. Wilke R.A., Riley D.A., Lelkes P.I., Hillard C.J. Decreased catecholamine secretion from the adrenal medullae of chronically diabetic BB-Wistar rats // Diabetes.- 1993.- Vol.42, N.6.- P.862-868.

Поступила 20.02.2008 г.

Сведения об авторах:

Абрамов А.В. – д.мед.н., профессор кафедры патологической физиологии ЗГМУ;
Колычева Н.Л. – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ЗГМУ;
Колесник Ю.М. – д.мед.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии, ректор ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Абрамов Андрей Владимирович, 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского 26, ЗГМУ, кафедра патологической физиологии. Тел.: (0612) 34-35-61