

© Колычева Н.Л., Абрамов А.В.

УДК 612.453.018.72:616.379-008.64-092.9

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОКРИНОЦИТОВ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

*Н.Л.Колычева, А.В.Абрамов*

*Кафедра патологической физиологии (зав. – проф. Ю.М.Колесник) Запорожского государственного медицинского университета*

---

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНДОКРИНОЦИТІВ КІРКОВОГО ШАРУ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

**Резюме.** Вивчені морфометричні характеристики, особливості синтезу РНК та білка c-Fos ендокриноцитами (Ец) кіркового шару надниркових залоз щурів на початкових стадіях розвитку стрептозоточин-індукованого діабету. Гіперглікемія призводить до збільшення чисельності Ец пучкової та сітчастої зон, підвищення в них концентрації РНК та рівня кортикостероїдів у крові. Встановлена висока кореляційна залежність між концентрацією білка c-Fos в Ец і рівнем глікемії ( $r=+0,71$ ) та концентрацією інсуліну в крові ( $r=-0,92$ ).

**Ключові слова:** надниркові залози, морфологія, цукровий діабет.

---

Одну из важных составляющих стресс-реализующей системы формируют эндокриноциты (Эц) коркового вещества надпочечных желез (НЖ), синтезирующие глюкокортикоиды и минералокортикоиды, обеспечивающие гормональные механизмы долговременной адаптации к действию стрессорных факторов. Вместе с тем известно, что длительный стресс, экспериментальная и клиническая терапия большими дозами глюкокортикоидов, болезнь Кушинга, сопровождающиеся гиперкортицизмом, приводят к формированию инсулинорезистентности и развитию стероидного диабета [1, 2]. Несмотря на то, что у пациентов с сахарным диабетом (СД) и у животных с экспериментальным диабетом в крови отмечается повышенный уровень кортикостероидов, гистофизиология коры НЖ при этих состояниях изучена недостаточно [2, 3].

**Цель исследования.** Изучить морфо-

метрические характеристики коркового вещества НЖ, особенности синтеза РНК и белка c-Fos эндокриноцитами при стрептозоточин-индуцированном СД.

**Материал и методы.** Исследования проведены на 60 самцах белых лабораторных крыс. СД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозоточина (Sigma, США) в дозе 50 мг/кг. Интактных самцов использовали в качестве контроля. Животные имели свободный доступ к пище и воде, которую в первые сутки после индукции СД заменяли 20 % раствором сахарозы. Животных выводили из эксперимента декапитацией под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), НЖ немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна на 24 ч. Фиксированные НЖ после стандартной гистологической проводки заливали в парафиновые блоки, из которых на ротационном микротоме MICROM HR360 (Германия) готовили серийные сре-

зы толщиной 5-6 мкм. Для выявления РНК срезы депарафинировали, регидрировали в нисходящих концентрациях этанола и окрашивали галлоцианин-хромовыми красками по Эйнарсону (Э.Пирс, 1962). Для выявления белка *c-Fos* в клетках коркового вещества НЖ срезы депарафинировали, регидрировали в нисходящих концентрациях этанола, отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (рН = 7,4), 24 ч инкубировали ( $T = 4^{\circ} C$ ) с мышиными IgG к белку *c-Fos* крысы (Sigma, США), а затем 1 ч ( $T = 37^{\circ} C$ ) – 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 коркового вещества НЖ определяли плотность Эц ( $мм^2$ ), концентрацию в них РНК (в единицах оптической плотности, ЕОП) и средний диаметр ядер клеток (мкм). Иммунофлюоресценцию получали с помощью фильтров возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм, измеряли площадь материала, иммунореактивного к *c-Fos* ( $мкм^2$ ), концентрацию белка *c-Fos* в Эц (в единицах иммунофлюоресценции – ЕИФ), плотность *c-Fos*-иммунопозитивных клеток (%). Уровень глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом, концентрацию инсулина и кортизола – иммуноферментным методом наборами фирмы DRG (США).

Полученные данные обработаны параметрической *t*-статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравни-

ваемых группах при  $P_{ст} < 0,05$ . Статистическую взаимозависимость между сравниваемыми параметрами оценивали методом корреляции (Л.Закс, 1976).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Моделирование СД у крыс с помощью стрептозотоцина приводит к массовой гибели бета-клеток панкреатических островков в первые сутки после введения антибиотика. При этом происходит массивное поступление в кровотока инсулина, что приводит к выраженной гипогликемии (табл. 1), несмотря на то, что животные в этот день получали 20 % раствор сахаразы. Ранее нами [4] отмечено, что острую гипогликемию следует рассматривать как стрессорный фактор, что подтверждается гиперсекрецией катехоламинов и достоверным повышением концентрации кортизола в крови. В дальнейшем из-за гибели бета-клеток у животных формировалась стойкая гипергликемия на фоне гипоинсулинемии. Несмотря на то, что у крыс в корковом веществе НЖ преимущественно синтезируется кортикостерон, в нашем исследовании мы определяли кортизол, который является минорной фракцией глюкокортикоидов. На протяжении первых 10 дней развития СД концентрация последнего в крови увеличивалась на 55-89 % по сравнению с интактными животными. При этом отмечалась положительная корреляционная зависимость между уровнем гликемии и концентрацией кортизола ( $r = +0,65$ ).

Наибольшая плотность Эц наблюдалась в клубочковой зоне, где численность клеток была на 48 % выше, чем в пучковой и на 37 %

Таблица 1

Биохимические показатели плазмы крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом ( $M \pm m$ )

Биохимический показатель	Интактные крысы	Сахарный диабет			
		1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Глюкоза, мМ/л	3,65±0,08	2,53±0,12*	9,27±0,35*	7,10±0,23*	7,86±0,26*
Инсулин, мкМЕ/мл	1,41±0,04	2,78±0,14*	0,93±0,06*	1,21±0,02*	1,23±0,07*
Кортизол, мМ/л	93,8±3,1	105,5±3,5*	129,3±4,0*	177,7±4,0*	145,0±5,1*

Примечание: (\*) – достоверные изменения ( $P_{ст} < 0,05$ ) по отношению к интактным животным.

выше, чем в сетчатой зонах (табл. 2). При этом ядра Эц клубочковой зоны отличались более высокой концентрацией РНК, показатели которой были на 8,8 % выше, чем в пучковой и на 18,7 % выше, чем в сетчатой зонах (табл. 3). В динамике развития СД в клубочковой зоне коры НЖ отмечались фазные изменения плотности Эц с повышением их удельной численности на 4-7 % на 1-е и 10-е сутки и снижением данного показателя на 7-12 % на 3-7 сутки течения патологического процесса. Эти изменения после формирования гипергликемии, начиная с 3-го дня, положительно коррелировали с динамикой изменения диаметра ядер клеток ( $r=+0,51$ ) и сопровождалась фазными изменениями концентрации РНК в Эц. Известно, что Эц клубочковой зоны коры НЖ синтезируют альдостерон и динамика изменения их морфофункциональных показателей, по-видимому, отражает фазную реакцию альдостерон-синтезирующей сис-

темы на метаболические и электролитные нарушения в динамике развития СД.

В пучковой зоне коркового вещества НЖ, синтезирующей глюкокортикоиды, а также в сетчатой зоне, синтезирующей, кроме указанных гормонов, и половые стероиды, развитие СД сопровождалось достоверным увеличением плотности Эц, численность которых на 10-й день увеличивалась на 57 % в пучковой и на 66 % в сетчатой зонах. На фоне непродолжительной по времени (3-7 сутки) гипертрофии ядер Эц отмечалось существенное накопление РНК в клетках, концентрация которой на 10-е сутки была на 57-68 % выше, чем в клетках интактных животных. Нарастание плотности Эц в гипергликемический период течения СД в обеих зонах положительно коррелировало с динамикой клеточной концентрации РНК ( $r=+0,75$  и  $r=+0,84$ ) и характеризовалось отрицательной корреляционной зависимостью по отношению к диамет-

Таблица 2

**Плотность эндокриноцитов ( $\text{мм}^2$ ) в морфофункциональных зонах коры надпочечных желез при экспериментальном сахарном диабете ( $M \pm m$ )**

Зоны коры надпочечных желез	Интактные крысы	Сахарный диабет			
		1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Клубочковая	8103±110	8434±124*	7089±295*	7584±173*	8373±107*
Пучковая	5477±129	7678±152*	7726±81*	6614±110*	8618±112*
Сетчатая	5928±111	8816±143*	9116±75*	7545±101*	9977±151*

Примечание: (\*) – достоверные изменения ( $P_{\text{ст}} < 0,05$ ) по отношению к интактным животным.

Таблица 3

**Диаметр ядер эндокриноцитов (мкм, в числителе) и концентрация в них РНК (ЕОП, в знаменателе) в морфофункциональных зонах коры надпочечных желез при экспериментальном сахарном диабете ( $M \pm m$ )**

Зоны коры надпочечных желез	Интактные крысы	Сахарный диабет			
		1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Клубочковая	$\frac{5,55 \pm 0,03}{0,285 \pm 0,001}$	$\frac{5,57 \pm 0,04^*}{0,144 \pm 0,002\#}$	$\frac{5,80 \pm 0,03^*}{0,441 \pm 0,005\#}$	$\frac{5,88 \pm 0,05^*}{0,210 \pm 0,009\#}$	$\frac{5,85 \pm 0,03^*}{0,306 \pm 0,003\#}$
Пучковая	$\frac{6,06 \pm 0,04}{0,262 \pm 0,001}$	$\frac{5,83 \pm 0,03^*}{0,450 \pm 0,011\#}$	$\frac{6,19 \pm 0,03^*}{0,448 \pm 0,002\#}$	$\frac{6,48 \pm 0,05^*}{0,341 \pm 0,002\#}$	$\frac{5,94 \pm 0,04}{0,419 \pm 0,002\#}$
Сетчатая	$\frac{5,54 \pm 0,03}{0,240 \pm 0,002}$	$\frac{5,84 \pm 0,03^*}{0,188 \pm 0,001\#}$	$\frac{5,54 \pm 0,02}{0,501 \pm 0,002\#}$	$\frac{6,13 \pm 0,09^*}{0,245 \pm 0,012}$	$\frac{5,46 \pm 0,03}{0,443 \pm 0,002\#}$

Примечание: достоверные ( $P_{\text{ст}} < 0,05$ ) изменения диаметра ядер эндокриноцитов (\*) и концентрации в них РНК (#) в отдельных зонах по отношению к интактным животным.

Таблиця 4

Плотность с-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов и концентрация в них белка с-Fos в коре надпочечных желез при экспериментальном сахарном диабете (M±m)

Показатели	Интактные крысы	Сахарный диабет			
		1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Плотность с-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов, ‰	5,25±0,12	1,16±0,06*	1,52±0,07	1,13±0,08*	7,47±0,14*
Концентрация с-Fos в эндокриноцитах, ЕИФ	1,15±0,02	0,52±0,01*	0,90±0,01*	0,64±0,01*	0,45±0,01*

Примечание: (\*) – достоверные изменения ( $P_{ST} < 0,05$ ) по отношению к интактным животным.

ру ядер клеток ( $r = -0,99$  и  $r = -0,97$  соответственно в пучковой и сетчатой зонах).

Вместе с тем, определение концентрации белка с-Fos (продукта активации ядерного протоонкогена с-fos, относящегося к так называемым генам "раннего реагирования") в корковом веществе НЖ у диабетических крыс показало выраженную депрессию данного показателя до 60 % от уровня интактных животных (табл. 4). В течение первой недели развития СД в корковом веществе НЖ примерно в 4,5 раза уменьшалась площадь материала, иммунореактивного к белку с-Fos. Однако на 10-е сутки данный показатель достоверно увеличился и на 42 % превышал показатель интактных крыс. В гипергликемический период течения СД показатель площади материала, иммунореактивного к белку с-Fos, положительно коррелировал с динамикой плотности Эц в пучковой и сетчатой зонах коры НЖ ( $r = +0,87$  и  $r = +0,81$  соответственно), в то время как между концентрацией белка с-Fos и РНК в Эц корреляции практически не наблюдалось ( $r = 0,35$ ). Характерно, что отсутствие значимой корреляционной зависимости отмечалось также между концентрацией белка с-Fos в корковом веществе НЖ и уровнем кортизола в крови ( $r = -0,4$ ). Возможно, данный факт свидетельствует о том, что уровень белка с-Fos не в полной мере отражает степень функциональной активности Эц коркового вещества НЖ.

Вместе с тем, следует принимать во

внимание кратковременность активации гена с-fos, следующую непосредственно за стрессом, а также характер самого стресса [5, 6]. Показано достоверное увеличение концентрации белка с-Fos в НЖ через 2 ч после электрического шока, через 24 ч после 2-часовой иммобилизации [7] и травматического шока [5], а хронический иммобилизационный стресс повышал экспрессию гена с-fos только через 4 нед [8], но не в первые 1-2 нед [7, 8]. В наших исследованиях определение белка с-Fos проводилось через 24 ч после индукции СД и вполне возможно, что экспрессия гена с-fos была не столь выраженной. Возможно, что определение белка с-Fos в первые часы после введения стрептозотоцина может выявить достоверное увеличение концентрации белка с-Fos в Эц, что в нашем исследовании подтверждается увеличением плотности клеток в коре НЖ и повышением концентрации в них РНК. Высокая корреляционная зависимость между уровнем белка с-Fos в Эц и концентрацией глюкозы ( $r = +0,71$ ) и инсулина ( $r = -0,92$ ) в крови диабетических животных также свидетельствует о повышении функциональной активности коркового вещества НЖ.

**Выводы.** 1. Начальный период развития экспериментального сахарного диабета (СД) сопровождается увеличением плотности эндокриноцитов (Эц) в пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечных желез (НЖ), нарастанием в них кон-

центрации РНК и повышением уровня кортизола в крови. 2. В динамике развития СД в клубочковой зоне НЖ наблюдается умеренное уменьшение плотности Эц и фазные изменения концентрации РНК. 3. Развитие экспериментального СД характеризуется начальной депрессией плотности с Fos-ммунопозитивных Эц, числен-

ность которых увеличивается к 10-му дню развития патологического процесса. 4. В гипергликемический период развития СД наблюдается высокая корреляционная зависимость между концентрацией белка c-Fos в Эц коркового вещества НЖ и концентрацией глюкозы ( $r=+0,71$ ) и инсулина ( $r=0,92$ ) в крови.

### Литература

1. Miller W.L. *The adrenal cortex* / W.L.Miller, J.B.Tyrrell // *Endocrinology and metabolism*; Eds. P.Felig, J.D.Baxter, L.A.Frohman. – 1995. – P. 555-712.
2. Балаболкин М.И. *Диабетология* / Балаболкин М.И. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.
3. Nijaradze L. *Изменения синтеза нуклеиновых кислот в надпочечниках во время развития аллоксанового сахарного диабета* / L.Nijaradze // *Изв. АН Грузии. Сер. биол.* – 2001. – Т. 27, № 1-3. – С. 169-174.
4. Абрамов А.В. *Особенности синтеза белка c-Fos и катехоламинов эндокриноцитами мозгового вещества надпочечных желез при сахарном диабете* / А.В.Абрамов, Н.Л.Колычева, Ю.М.Колесник // *Патология.* – 2008. – Т. 5, № 1. – С. 68-71.
5. *Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems* / E.L.Sabban, M.A.Hebert, X.Liu [et al.] // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1032. – P. 130-140.
6. *Janknecht R. Regulation of the c-fos promoter* / R.Janknecht // *J. Immunobiology.* – 1995. – Vol. 193. – P. 137-140.
7. *Fos-related antigen 2: Potential mediator of the transcriptional activation in rat adrenal medulla evoked by repeated immobilization stress* / B.B.Nankova, M.Rivkin, M.Kelz [et al.] // *J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 20, № 15. – P. 5647-5653.
8. *Effect of chronic intermittent immobilization stress on Fos-like immunoreactivity in rat brain and adrenal medulla* / I.Roske, M.E.Hughes, P.Newson [et al.] // *Stress.* – 2002. – Vol. 4, № 5. – P. 277-283.

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОКРИНОЦИТОВ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

**Резюме.** Изучены морфометрические характеристики, особенности синтеза РНК и белка c-Fos эндокриноцитами (Эц) коркового вещества надпочечных желез крыс в начальных стадиях развития стрептозотоцин-индуцируемого диабета. Гипергликемия приводит к увеличению численности Эц пучковой и сетчатой зон, повышению в них концентрации РНК и уровня кортикостероидов в крови. Установлена высокая корреляционная зависимость между концентрацией белка c-Fos в Эц, уровнем гликемии ( $r=+0,71$ ) и концентрацией инсулина в крови ( $r=-0,92$ ).

**Ключевые слова:** надпочечные железы, морфология, сахарный диабет.

### MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ENDOCRINOCYTES OF THE ADRENAL CORTEX IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

**Abstract.** The authors have studied the morphometric characteristics the peculiarities of the synthesis of RNA and protein c-Fos by endocrinocytes (EC) of the cortical layer of the adrenal glands of rats at the initial stages of the development of streptosotocininduced diabetes. Hyperglycemia results in an increase of the member of the EC fascicular and reticular zones, an elevation of the blood RNA concentration and corticosteroid level in them. A high correlation dependence between the concentration of the blood c-Fos concentration in Ecs and the level of glycemia ( $r=+0,71$ ) and insulin concentratioun ( $r=0,92$ ) has been established.

**Key words:** suprarenal glands, morphology, diabetes mellitus.

State Medical University (Zaporizhzhia)

Надійшла 07.11.2008 р.

Рецензент – проф. С.С.Ткачук (Чернівці)