

А.В.Абрамов, Н.Л.Колычева, Г.И.Бессараб

ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРОВ СИНТЕЗА МОНОАМИНОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: *L-тирозин, α-метил-L-тирозин, катехоламины, надпочечные железы, сахарный диабет.*

В эксперименте на крысах показано, что 10-дневное введение предшественника синтеза моноаминов L-тирозина приводит к активации эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечных желез и увеличению синтеза и секреции катехоламинов в норме и нарушает реакцию адреномедуллярной системы при экспериментальном сахарном диабете. Десятидневное введение блокатора синтеза катехоламинов α-метил-L-тирозина нормальным и диабетическим животным угнетает функциональную активность эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечников и приводит к снижению пула катехоламинов в железах и крови.

ВПЛИВ ІНДУКТОРІВ СИНТЕЗУ МОНОАМІНІВ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МОЗКОВОЇ РЕЧОВИНИ НАДНИРНИКІВ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

А.В.Абрамов, Н.Л.Колычева, Г.И.Бессараб

В експерименті на щурах показано, що введення попередника синтезу моноамінів L-тирозину протягом 10 діб призводить до активації ендокриноцитів медулярної речовини надниркових залоз та збільшенню синтезу та секреції катехоламінів в нормі та порушує реакцію адреномедулярної системи при експериментальному цукровому діабеті. Введення протягом 10 діб блокатору синтезу катехоламінів α-метил-L-тирозину нормальним та діабетичним тваринам пригнічує функціональну активність ендокриноцитів медулярної зони наднирок і призводить до зниження пулу катехоламінів у залозах та крові.

Ключові слова: *L-тирозин, α-метил-L-тирозин, катехоламіни, надниркові залози, цукровий діабет.*

Патологія. – 2008. – Т5., №4. – С. 18-21

INFLUENCES OF THE MONOAMINE SYNTHESIS PRECURSORS ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF ADRENAL GLAND IN DIABETES MELLITUS

A.V. Abramov, N.L. Kolycheva, Bessrab G.I.

It has been shown on experimental rats that injections L-tyrosine over the time of 10 days amplify activity cells in medulla and increase synthesis and secretion of catecholamines in normal rats and has caused disorders in rats with diabetes mellitus. The injections α methyl L- tyrosin over the time of 10 days decrease synthesis and secretion, concentration of catecholamines pul in adrenal glands and blood.

Key words: *L-tyrosine, α-methyl-L- tyrosine, catecholamines, adrenal glands, diabetes mellitus.*

Pathologia. 2008; 5(4): 18-21

Развитие сахарного диабета сопровождается эндокринными изменениями не только островкового аппарата поджелудочной железы, но и формированием дисфункции эндокринной системы в целом [1,2,3]. Ранее нами было показано, что первоначальная реакция надпочечных желез при экспериментальном диабете у крыс по характеру эндокринных и биохимических изменений отражает стрессорный характер реакции организма на развитие патологического процесса [4]. Это проявлялось увеличением удельного количества эндокриноцитов в медуллярной зоне надпочечников, повышению в них концентрации РНК и синтеза катехоламинов [5]. При этом у диабетических животных исчезала реакция надпочечных желез на многодневное введение L-тирозина, которое у нормальных крыс приводило к повышению концентрации катехоламинов в крови, и в определенной мере сохранялась реакция надпочечников на многодневное введение блокатора синтеза катехоламинов α-метил-L-тирозина [6]. Вместе с тем, морфологические критерии изменения функциональной активности эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечных желез при введении индукторов синтеза катехоламинов не были изучены.

ЦЕЛЬЮ исследования было изучить влияние многодневного введения α-тирозина и L-метил-L-тирозина на морфофункциональное состояние эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечников в норме и при развитии экспериментального сахарного диабета у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследования проведены на 72 самцах белых лабораторных крыс, которые были распределены на 6 экспериментальных групп по 12 особей в каждой: 1-3 группы нормальные крысы, 4-6 группы крысы, которым моде-

лировали сахарный диабет однократным внутривентриальным введением стрептозотоцина (Sigma, США кат. № S0130) в дозе 50 мг/кг. Животным 2-й и 5-й групп внутривентриально вводили L-тирозин (Sigma, США, кат. № T3754) в дозе 100 мг/кг; животным 3-й и 6-й групп внутривентриально вводили α-метил-L-тирозин (Sigma, США, кат. № M8131) в дозе 10 мг/кг. Введение препаратов осуществляли в течение 10 дней, причем в 5-й и 6-й группах начинали на следующий день после моделирования диабета. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Через сутки после последнего введения препаратов на фоне 16-часового голодания крыс выводили из эксперимента декапитацией под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), кровь собирали, охлаждали и получали плазму, а надпочечные железы немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна на 24 часа. Фиксированные надпочечники после стандартной гистологической проводки 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 [7].

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 мышиными IgG к белку cFos 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

Биохимические показатели плазмы у крыс с экспериментальным диабетом (M±m)

Показатели	Глюкоза, мМ/л	Адреналин плазмы, нМ/л	Адреналин надпочечников, нМ/г	Норадреналин плазмы, нМ/л	Норадреналин надпочечников, нМ/г
Нормальные крысы	3,65±0,08	5,54±0,06	115,8±6,7	5,19±0,03	133,8±8,7
Нормальные крысы + L-тирозин	5,03±0,13*	5,97±0,10*	93,2±1,9*	6,08±0,09*	70,1±1,6*
Нормальные крысы + α-метил-L-тирозин	2,98±0,11* [§]	5,69±0,06 [§]	68,9±2,0* [§]	4,52±0,07* [§]	64,1±3,0*
Диабетические крысы	7,86±0,26	6,34±0,11	129,2±2,9	5,62±0,11	116,9 3,6
Диабетические крысы + L-тирозин	7,90±0,29	5,63±0,07 [#]	120,9±2,7	4,98±0,04 [#]	83,1±2,1 [#]
Диабетические крысы + α-метил-L-тирозин	6,76±0,26 ^{#§}	5,03±0,09 ^{#§}	98,3±2,0 ^{#§}	4,91±0,07 [#]	64±2,4 ^{#§}

Примечание: достоверные отличия $P_{ST} < 0,05$ по отношению к группе контрольных (*), диабетических (#), а также крыс с введением тирозина (§).

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), 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 с-Fos (мкм²), концентрацию белка с-Fos в эндокриноцитах (в единицах иммунофлюоресценции – ЕИФ), плотность с-Fos–иммунопозитивных клеток (%).

Уровень глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом глюкометром GlucocardII, а концентрацию инсулина и кортизола – иммуноферментным методом наборами фирмы DRG (США).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической t-статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $P_{ST} < 0,05$. Статистическую взаимозависимость между сравниваемыми параметрами оценивали методом корреляции [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение предшественника синтеза моноаминов L-тирозина нормальным крысам приводило достоверному увеличению концентрации адреналина (на 7,8±1,8%) и норадреналина (на 17,2±1,9%) в крови (табл. 1), содержание которых в гомогенатах надпочечников существенно снижалось (на 19,5±1,6% и 47,6±1,1%, соответственно), вероятно, вследствие усиленной секреции катехоламинов в периферический кровоток. При этом в крови отмечалось повышение уровня гликемии до верхних пороговых значений нормы и умеренное снижение концентрации инсулина в плазме. Морфологический анализ медулярной зоны надпочечных желез показал, что многодневное

введение L-тирозина приводило к повышению удельного количества эндокриноцитов на 10% ($P_{ST} < 0,05$) с увеличением численности с-Fos–иммунопозитивных клеток на 32% ($P_{ST} < 0,05$) по отношению к нормальным животным (табл. 2). Как известно, белок с-Fos является продуктом активации ядерного протоонкогена с-fos, относящегося к так называемым генам «раннего реагирования», и представляющим собой основную ядерную мишень для передачи сигналов регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [9,10]. Следует отметить, что увеличением численности с-Fos–иммунопозитивных эндокриноцитов сопровождалось снижением в клетках концентрации белка с-Fos на 21% ($P_{ST} < 0,05$) при том, что концентрация РНК в эндокриноцитах увеличивалась на 74% ($P_{ST} < 0,05$). Такой эффект снижения концентрации белка с-Fos можно объяснить свойством протоонкогена с-fos достаточно быстро, но кратковременно, активироваться в ответ на воздействия самого широкого спектра [11], после чего он переключается на регуляцию так называемых «поздних генов» регуляции клеточного роста [12].

Введение блокатора синтеза моноаминов α-метил-L-тирозина нормальным животным вызывало умеренное (на 12,9±1,3%, $P_{ST} < 0,05$) снижение концентрации норадреналина в крови без изменения концентрации адреналина (см. табл. 1). При этом содержание катехоламинов в ткани надпочечников снижалось на 40-50%, что являлось достоверным ($P_{ST} < 0,05$) по отношению к группе крыс с введением L-тирозина. Учитывая биохимический цикл синтеза катехоламинов и тот факт, что в медулярной зоне надпочечников у крыс преобладает содержание норадреналина [13], полученные результаты свидетельствовали об торможении синтеза норадреналина в надпочечниках нормальных крыс под влиянием α-метил-L-тирозина при сохранении ферментозависимой конверсии норадреналина в конечный продукт – адреналин.

Морфологічна характеристика мозгового речовини надпочечників у нормальних крыс (M±m)

Показатели	Нормальные крысы	Нормальные крысы + L-тирозин	Нормальные крысы + α-метил-L-тирозин
Плотность эндокриноцитов, мм ⁻²	6594±136	7290±200*	6109±163*§
Диаметр ядер эндокриноцитов, мкм	5,80±0,04	5,50±0,02*	5,59±0,04*§
Концентрация РНК, мЕоп	221±1	856±3*	552±2*§
Плотность c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов, ‰	3,78±0,15	5,57±0,24*	3,28±0,22*§
Концентрация c-Fos в эндокриноцитах мЕиФ	1633±67	1289±58*	698±11*§

Примечание: достоверные отличия $P_{ST} < 0,05$ по отношению к группе нормальных (*) крыс и животных с введением L-тирозина (§).

Морфологический анализ медуллярной зоны надпочечных желез показал, что многодневное введение α-метил-L-тирозина вызывало уменьшение численности эндокриноцитов на 7% ($P_{ST} < 0,05$) по отношению к нормальным животным и на 15% ($P_{ST} < 0,05$) по отношению к аналогичному показателю у крыс с введением L-тирозина (см. табл. 2). При этом в медуллярной зоне надпочечников на 13% ($P_{ST} < 0,05$) по сравнению с нормальными животными, и на 41% ($P_{ST} < 0,05$) по сравнению с группой крыс с введением L-тирозина, уменьшалась численность c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов. При этом в клетках на 57% ($P_{ST} < 0,05$) снижалась концентрация белка c-Fos.

Следовательно, полученные результаты на морфологическом уровне подтверждают активацию процессов биосинтеза катехоламинов в надпочечниках после многодневного введения L-тирозина и торможение этих процессов после многодневного введения α-метил-L-тирозина.

Развитие сахарного диабета у крыс приводило к стойкой гипергликемией, гипoinsулинемией, повышением концентрации катехоламинов в плазме и надпочечных (см. табл. 1). При этом в медуллярной зоне надпочечных желез на 9% ($P_{ST} < 0,05$) по сравнению с нормальными животными нарастало удельное количество эндокриноцитов при уменьшении численности c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов на 29% ($P_{ST} < 0,05$), а также снижении концентрации РНК и белка c-Fos в клетках в 2 раза (см. табл. 2 и 3). Десятидневное введение таким животным L-тирозина не оказывало существенного влияния на показатели концентрации глюкозы и инсулина в крови, но приводило к достоверному снижению концентрации адреналина и норадреналина в плазме (на 11%, $P_{ST} < 0,05$) и содержанию норадреналина в надпочечниках (на 29%, $P_{ST} < 0,05$). При этом в медуллярной зоне надпочечников на 48% ($P_{ST} < 0,05$) увеличивалось количество c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов в сочетании с повышением в клетках концентрации РНК на 8% ($P_{ST} < 0,05$) и

уменьшением концентрации белка c-Fos на 26% ($P_{ST} < 0,05$) (табл. 3). Таким образом, развитие экспериментального сахарного диабета у крыс приводит к нарушению реакции аденомедуллярной системы на введение предшественника синтеза катехоламинов L-тирозина, что проявляется угнетением синтеза моноаминов на фоне сохранения активирующего влияния L-тирозина на клеточный геном эндокриноцитов.

Введение диабетическим животным α-метил-L-тирозина достоверно снижало концентрацию катехоламинов в крови и в ткани надпочечных желез. При этом в эндокриноцитах на 47% ($P_{ST} < 0,05$) увеличивалась концентрация РНК и на 32% ($P_{ST} < 0,05$) снижалась концентрация белка c-Fos. Следовательно, реакция мозгового вещества надпочечных желез у диабетических крыс на введение блокатора синтеза моноаминов α-метил-L-тирозина практически идентична той, которая наблюдается у нормальных животных. Вместе с тем, развитие сахарного диабета у крыс нивелирует тормозящее влияние L-метил-L-тирозина на пролиферацию эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечников, о чем свидетельствует отсутствие эффекта вводимого блокатора синтеза моноаминов на численность клеточной популяции.

ВЫВОДЫ

1. Десятидневное введение предшественника синтеза моноаминов L-тирозина приводит к активации эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечных желез и увеличению синтеза и секреции катехоламинов в норме и нарушает реакцию аденомедуллярной системы при экспериментальном сахарном диабете.

2. Десятидневное введение блокатора синтеза катехоламинов α-метил-L-тирозина нормальным и диабетическим животным угнетает функциональную активность эндокриноцитов медуллярной зоны надпочечников и приводит к снижению пула катехоламинов в железах и крови.

Морфофункціональна характеристика мозгового речовини надпочечників у крыс с експериментальним сахарним діабетом (M±m)

Показатели	Диабетические крысы	Диабетические крысы + L-тирозин	Диабетические крысы + α-метил-L-тирозин
Плотность эндокриноцитов, мм ⁻²	7164±118	7636±209	7096±149 [§]
Диаметр ядер эндокриноцитов, мкм	5,23±0,05	5,03±0,03 [#]	5,52±0,02 ^{#§}
Концентрация РНК, ME _{оп}	328±3	354±1 [#]	482±2 ^{#§}
Плотность c-Fos-иммунопозитивных эндокриноцитов, ‰	2,67±0,15	3,94±0,14 [#]	2,58±0,11 [§]
Концентрация c-Fos в эндокриноцитах ME _{иф}	682±7	501±7 [#]	462±3 ^{#§}

Примечание: достоверные отличия $P_{st} < 0,05$ по отношению к группе диабетических (#) крыс и животных с введением L-тирозина (§).

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесник Ю.М., Орловский М.А. Панкреатические островки: некоторые аспекты анатомии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете 1 типа // Проблемы Эндокринологии. – 2004. – Т.50, №2. – С.3-10.
 2. 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.
 3. Kolesnik Yu.M., Abramov A.V.; Melnikova O.V. Interaction of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal and peptidergic systems of the hypothalamus in animals with experimental diabetes mellitus // Neurosci. Behav. Physiol. 1997. – Vol.27, No.1. – P.92-96
 4. Колычева Н.Л., Абрамов А.В. Особенности содержания катехоламинов в надпочечных и поджелудочной железах крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Патология. - 2008. - Т.5, №3. - С.15-17
 5. Абрамов А.В., Колычева Н.Л., Колесник Ю.М. Особенности биосинтеза белка c-Fos и катехоламинов эндокриноцитами мозгового вещества надпочечных желез при сахарном диабете // Патология. - 2008. - Т.5, №1. - С.68-71

6. Колычева Н.Л., Ганчева О.В. Влияние индукторов синтеза моноаминов на продукцию катехоламинов при сахарном диабете // Запорожский медицинский журнал. — 2008. — №5. — С.31—34.
 7. Пирс Э. Гистохимия. - М.: «Изд-во ин. лит.»- 1962. -962 с.
 8. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: «Статистика»,
 9. 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.
 10. Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation // Histol. Histopathol. – 2000. - Vol.15. – P.921–928.
 11. Janknecht R. Regulation of the c-fos promoter // J.Immunobiology. – 1995. – Vol.193. – P.137–140.
 12. Анохин К. В. Психофизиология и молекулярная генетика мозга / Основы психофизиологии. Под. ред. Ю.И.Александрова. — СПб., 2001.
 13. 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.

Сведения об авторах:

А.В.Абрамов, д.мед.н., профессор кафедры патологической физиологии ЗГМУ, Н.Л.Колычева, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Бессараб Г.И., доц. каф. нормальной физиологии

Адрес для переписки:

69035, г. Запорожье, пр. Маяковского 26, ЗГМУ, Кафедра патологической физиологии
 Тел.: (0612)34-35-61, А.В.Абрамов