



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

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА И ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: монооксид азота, катехоламины, надпочечные железы, сахарный диабет

В эксперименте изучены особенности активности NO-синтазы и уровень стабильных метаболитов NO в надпочечниках крыс в начальных стадиях развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Показано, что развитие патологического процесса сопровождается увеличением активности NO-синтазы в 1,5-2 раза, а нитритов в плазме - в 2,5 раза. Отмечен стрессорный характер реакции надпочечников на развитие диабета, что подтверждалось повышением в крови концентрации кортизола на 89% и катехоламинов на 8-14% при умеренном снижении содержания последних в железах. Между активностью NO-синтазы или концентрацией нитритов в ткани/плазме и уровнем гормонов надпочечников в крови установлена высокая корреляционная зависимость: положительная для кортизола и отрицательная для катехоламинов.

Монооксид азота (NO) является универсальным мессенджером, принимающим участие в регуляции физиологических и метаболических процессов, как в отдельной клетке, так и в целом организме [1]. NO является аутокринным и паракринным регулятором синтеза гормонов в эндокринных железах, в частности, в надпочечниках, где вместе с серотонином, эндорфинами, эндотелином и ростовыми факторами контролирует стероидогенез и биосинтез катехоламинов [2]. Источником NO в надпочечниках выступают эндотелиальные клетки, а также макрофаги [3]. Показано, что в интактных надпочечниках человека и животных NO главным образом угнетает образование альдостерона [3,4,5] и тормозит активность допамин-бета-гидроксилазы [6]. Вместе с тем, особенности продукции NO в надпочечниках и его влияние на биосинтез глюкокортикоидов и катехоламинов при экспериментальном диабете не изучены, хотя гипергликемическая направленность эффектов этих гормонов хорошо известна.

Цель исследования – изучить состояние синтеза монооксида азота и гормонов надпочечных желез в динамике развития экспериментального 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, которую в первые сутки после индукции диабета заменяли 20% раствором сахарозы. Животных выводили из эксперимента декапитацией под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Уровень глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом, а концентрацию инсулина и кортизола - иммуноферментным методом наборами фирмы DRG (США). Концентрацию адреналина и норадреналина в

плазме и в гомогенатах надпочечников оценивали флюорометрически [7], уровень стабильных метаболитов NO (нитритов) – по методу Гриса [8], концентрацию NO-синтазы в гомогенатах ткани - флюорометрически [9]. 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 экспериментальным животным приводило к массовой гибели бета-клеток панкреатических островков и высвобождению из них инсулина, концентрация которого в крови возрастала в 2 раза (табл. 1). Это сопровождалось выраженной гипогликемией в первые сутки, несмотря на то, что животные в этот день получали для питья 20% раствор сахарозы. Кроме того, в первые сутки развития диабета в плазме крови на 20,5% ($P_{ST} < 0,05$) увеличивалась концентрация адреналина, на 6,8% ($P_{ST} < 0,05$) - уровень норадреналина и на 12,4% ($P_{ST} < 0,05$) - концентрация кортизола. 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 до $1,34 \pm 0,03$ против $0,87 \pm 0,03$ в группе интактных крыс ($P_{ST} < 0,05$). Подобная реакция со стороны адреналокортикальной системы надпочечников однозначно свидетельствовала о стрессорном характере острой гипогликемии, вызванной быстрой деструкцией бета-клеток.

Характерно, что подобная реакция со стороны надпочечников сопровождалась увеличением активности NO-синтазы в 1,5 раза и концентрации стабильных метаболитов NO в плазме на 33,8% ($P_{ST} < 0,05$) при снижении содержания нитритов в самих надпочечниках на 15,2% ($P_{ST} < 0,05$).

Таблица 1

Биохимические показатели плазмы и гомогената надпочечников крыс с экспериментальным диабетом (M±m)

Показатели	Интактные крысы	Диабет, сутки после моделирования			
		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*
Инсулин плазмы, мкМЕ/мл	1,41±0,04	2,78±0,14*	0,93±0,06*	1,21±0,02*	1,23±0,07*
Кортизол плазмы, мМ/л	93,8±3,1	105,5±3,5*	129,3±4,0*	177,7±4,0*	145,0±5,1*
Активность NO-синтазы в ткани, мкМ/г белка*мин.	9,43±0,71	14,80±0,80*	11,20±0,62	18,98±1,15*	15,97±0,79*
Нитриты ткани, мкМ/г белка	1,75±0,07	1,48±0,09*	1,73±0,07	3,72±0,27*	2,08±0,08*
Нитриты плазмы, пМ/л	91,5±3,8	122,4±6,5*	100,0±4,2	237,7±13,5*	161,0±6,8*
Адреналин ткани, нМ/г	115,8±6,7	153,7±4,1?	102,8±4,2	99,3±2,7?	129,2±2,9
Адреналин плазмы, нМ/л	5,54±0,06	6,68±0,06*	6,45±0,13*	4,66±0,10*	6,34±0,11*
Норадреналин ткани, нМ/г	133,8±8,7	115,2±3,8*	108,4±4,8?	83,5±2,5?	116,9±3,6
Норадреналин плазмы, нМ/л	5,19±0,03	5,54±0,09*	5,7±0,08*	5,50±0,08*	5,62±0,11*

(*) - достоверные изменения ($P_{ST} < 0,05$) по отношению к группе интактных крыс

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 пиком гипергликемии на 3-и сутки, что было обусловлено эпизодическим снижением концентрации инсулина в крови на 34,2% ($P_{ST} < 0,05$).

В надпочечниках уменьшалось депо катехоламинов, и к 7-м суткам концентрация адреналина снижалась и становилась на 14,2% меньше ($P_{ST} < 0,05$), а норадреналина на 37,6% меньше ($P_{ST} < 0,05$), чем у интактных крыс. 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 ($P_{ST} > 0,05$, $P_U > 0,05$). Тем не менее, реакция надпочечников в этот период течения патологического процесса сохраняла признаки стрессорной: несмотря на уменьшение концентрации катехоламинов в железе, их уровень в крови оставался повышенным на 8-14% ($P_{ST} < 0,05$), а концентрация кортизола в крови нарастала и к 7-м суткам течения диабета была на 89,4% выше, чем у интактных крыс.

К 7 м суткам развития патологического процесса активность NO-синтазы в надпочечниках и концентрация в них нитритов увеличивалась в 2 раза, а уровень последних в плазме – в 2,5 раза. При этом наблюдалась высокая положительная корреляционная зависимость между уровнем активности NO-синтазы в надпочечниках или концентрацией нитритов в тка-

ни/плазме с одной стороны, и концентрацией кортизола, с другой (от $r = +0,7$ до $r = +0,95$).

Полученные данные несколько противоречат доминирующему мнению о влиянии NO на стероидогенез. Так в эксперименте на интактных надпочечниках *in vitro* была отмечена способность NO угнетать биосинтез стероидов [3,4,5], а также тормозить базальную и АКТГ-стимулированную секрецию минералокортикоидов [10]. Причем данный эффект является дозозависимым [10] и по механизму реализации может быть как прямым, т.е. цГМФ-независимым [4], так и обусловленным NO-опосредованной блокадой синтеза рецепторов I типа к ангиотензину-II [11]. С другой стороны, есть данные об усилении синтеза глюкокортикоидов в интактных надпочечниках при их перфузии донорами NO и отсутствии подобного эффекта в отношении синтеза альдостерона [12]. Мы полагаем, что NO, равно как и другие медиаторы и гормоны, в условиях развития патологических процессов способны реализовать свои эффекты несколько иначе, чем в интактной ткани. Выше указывалось на стрессорный характер гормональной реакции надпочечников при развитии сахарного диабета. Ранее нами была показана роль гипоталамических структур и синтезируемых ими нейропептидов в патогенезе экспериментального сахарного диабета [13,14]. Усиление секреции гипоталамического кортиколиберина и АКТГ на наш взгляд играет решающую роль в стимуляции секреции кортикостероидов. Вместе с тем показано, что АКТГ, усиливая биосинтез стероидов, одновременно стимулирует эндотелиальную и конституциональную NO-синтазу, повышая продукцию NO в надпочечниках как механизм паракринного негативного контроля стероидогенеза [2]. Таким образом, полученные



нами данные об усилении продукции кортизола и NO в надпочечниках очевидно не противоречат друг другу и, вероятно, свидетельствуют о том, что усиление образования NO при диабете играет роль стресс-лимитирующего звена в общем нейроэндокринном ответе организма на развитие патологического процесса.

Анализируя взаимоотношение образования NO и катехоламинов в надпочечниках, следует отметить способность NO тормозить активность допамин-бета-гидроксилазы и тем самым нарушать конверсию допамина в норадреналин [6], что в определенной мере способствует уменьшению вазоконстрикторного пула катехоламинов и развитию вазодилаторного эффекта и ускорения кровотока, в том числе и в самих надпочечниках [5,15]. С этим хорошо согласуются полученные нами данные, свидетельствующие о снижении содержания катехоламинов в гомогенатах надпочечников на фоне повышения активности NO-синтазы и пула стабильных метаболитов NO при диабете. Кроме того, установлена высокая отрицательная корреляционная зависимость между уровнем активности NO-синтазы в надпочечниках при диабете, а также между концентрацией нитритов в ткани/плазме с одной стороны, и концентрацией катехоламинов в ткани надпочечников (от $r = -0,63$ до $r = -0,93$) и в крови (от $r = -0,73$ до $r = -0,99$), с другой стороны. Таким образом, несмотря на повышенный уровень катехоламинов в крови, в целом их продукция в организме, по-видимому, подчиняется регуляторным влияниям изменяющейся концентрации NO в хромаффинной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального сахарного диабета у крыс сопровождается повышением в крови концентрации кортизола, катехоламинов и стабильных метаболитов NO, отражая стрессорный характер реакции надпочечников на развитие патологического процесса.

2. В надпочечных железах диабетических животных отмечается повышение активности NO-синтазы и концентрации стабильных метаболитов NO в сочетании с уменьшением содержания адреналина и норадреналина.

3. Усиление образования NO в надпочечниках следует рассматривать как стресс-лимитирующее звено, направленное на ограничение активации симпатoadrenalовой и адренокортикальной систем при сахарном диабете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monocada S., Palmer R.M.I., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.*- 1991.- Vol.43.- P.109-141.
2. Repetto E.M., Pannunzio V., Astort F. et al. Characterization of L-arginine transport in adrenal cells:

effect of ACTH // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Methab.*- 2006.- Vol. 291.- P.E291-E297.

3. Craig H.J., Campbell W.B. Endothelial cell nitric oxide inhibits aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells: modulation by oxygen // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Methab.*- 2000.- Vol. 279.- P.846-854.
4. Cymeryng C.B., Dada L.A., Podesta E.J. Effect of nitric oxide in rat adrenal zona fasciculate steroidogenesis // *J. Endocrinol.*- 1998.- Vol. 158.- P.197-203.
5. Riquime R.A., Sandhez G., Liberona I. et al. Nitric oxide plays a role in the regulation of adrenal blood flow and adrenocorticomedullary function in llama fetus // *J. Physiol.*- 2002.- Vol.544.- P.257-276.
6. Zhou X., Espey M.G., Chen J.X. et al. Inhibitory effects of nitric oxide and nitrosative stress on dopamine-beta-hydroxylase // *J. Biol. Chemistry.*- 2000.- Vol.275.- P.21241-21248.
7. Патент України №11450, G01N33/48. Спосіб визначення адреналіну та норадреналіну в одній пробі біологічного матеріалу / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., та співавт. // Дата видачі 15.12.2005. Опубл.- 2005.- №12.
8. Горбунов Н.В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток - зёрен мозжечка // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* - 1995. - №7. - с. 40 - 48.
9. Патент України №13132, G01N33/48. Спосіб визначення вмісту ферменту NO-синтази в гомогенатах тканин / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., та співавт. // Дата видачі 15.03.2006. Опубл.- 2006.- №3.
10. Sainz J.M., Reche C., Rabbano M.A. et al. Effects of nitric oxide on aldosterone synthesis and nitric oxide synthase activity in glomerulosa cells from bovine adrenal gland // *Endocrine.*- 2004.- Vol.24.- P.61-71.
11. Usui M., Ichiki T., Katoh M. et al. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland // *Hypertension.*- 1998.- Vol.32.- P.527-533.
12. Haynes W.G., Hang M.F., Dockrell M.E.C. et al. Physiological role of nitric oxide in regulation of renal function in humanus // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*- 1997.- Vol.272.- P.4053-4060.
13. 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.
14. Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Жулинский В.А., с соавт. Коррекция иммуно-эндокринных нарушений при экспериментальном сахарном диабете введением гипоталамических нейропептидов // *Клін.*



експерим. патологія.- 2004.- №2, ч.1.- С.120-123.
15. Cameron L.A., Hinson J.P. The role of nitric oxide derived from L-arginine in the control of

steroidogenesis, and perfusion medium from rate in the isolated perfused rat adrenal gland // J. Endocrinol.- 1993.- Vol. 139.- P.415-423.

Поступила 14.04.2008г.

Н.Л.Количева, Ю.М.Колесник, А.В.Абрамов, О.В.Ганчева

Особливості синтезу монооксиду азоту та гормонів надниркових залоз при цукровому діабеті

В експерименті були вивчені особливості активності NO-синтази та рівень стабільних метаболітів NO у надниркових залозах щурів на початкових стадіях розвитку стрептозотоцинового цукрового діабету. Було показано, що розвиток патологічного процесу супроводжується збільшенням активності NO-синтази у 1,5-2 рази, а нітритів у плазмі - у 2,5 рази. Було відмічено стресовий характер реакції надниркових залоз на розвиток діабету, що підтверджувалося збільшенням в крові концентрації кортизолу на 89% та катехоламінів на 8-14%, з одночасним зниженням кількості останніх у залозах. Між активністю NO-синтази або концентрацією нітритів у тканині/плазмі та рівнем гормонів надниркових залоз у крові встановлено високу кореляційну залежність - позитивну для кортизолу та негативну для катехоламінів.

Ключові слова: монооксид азоту, катехоламіни, надниркові залози, цукровий діабет

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

Peculiarity of the nitric oxide and adrenal glands' hormones synthesis in diabetes mellitus

Peculiarity of the NO-synthase's activity and level of NO's stable metabolites in adrenal gland in initial stages of the streptozotocine-induced diabetes development in rats were learned in experiment. It was shown that development of this pathology is attended by increase of NO-synthase's activity in 1.5-2 times and level of nitrites in serum in 2.5 times. Stressful character of adrenal gland's reaction on the development of diabetes confirmed in increase of cortisol's level in 89% and catecholamines' level in 8-14% in blood with decrease of it's level in glands was noticed. High correlated dependence - positive for cortisol and negative for catecholamines, was found between NO-synthase's activity or nitrites' concentration in serum/tissue and level of the adrenal gland's hormones in blood.

Key words: nitric oxide, catecholamines, adrenal glands, diabetes mellitus

Сведения об авторах:

Колычева Н.Л., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии;

Колесник Ю.М., д.мед.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии ЗГМУ;

Абрамов А.В., д.мед.н., профессор кафедры патологической физиологии ЗГМУ;

Ганчева О.В., к.мед.н., доцент кафедры патологической физиологии ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Абрамов А.В., 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского 26, ЗГМУ, кафедра патологической физиологии.

Тел.: (0612) 34-35-61