

13. Kahn C.R. The molecular mechanism of insulin action // Annu. Rev. Med. — 1985. — 35. — P. 429—451.
14. Kilo C. Value glucose control in preventing complications of diabetes // Amer. J. Med. — 1985. — 79, № 10. — P. 33—37.
15. Lee J.C., Downing S.E. Effects of glucose on cardiac muscle contraction and responsiveness to norepinephrine // Amer. J. Physiol. — 1976. — 230, № 12. — P. 1360—1365.
16. Liang C.-S., Doherty J.U., Faillace R. et al. Insulin infusion in conscious dogs. Effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma catecholamines // J. Chin. Invest. — 1982. — 69, № 6. — P. 1321—1336.
17. Page M., Smith R.B.W., Watkins P.J. Cardiovascular effects of insulin // Brit. Med. J. — 1976. — 1, № 3. — P. 430—432.
18. Pape J., Jervell J. Blood pressure and pulse response to insulin-induced hypoglycemia during nonselective beta-blockade // Acta endocrinol. — 1980. — 94, Suppl, № 237. — P. 67—70.
19. Resh M.D. Insulin action on the $(Na^+, K^+)ATPase$ // Mol. Basis Insulin Action. — 1985. — P. 451—464.
20. Wallace J.M., Harlan W.R. Significance of epinephrine in insulin hypoglycemia in man // Amer. J. Med. — 1965. — 38, № 3. — P. 531—539.

Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім. В.П.Комісаренка АМН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 05.05.93

УДК 612.453.018:[616.453]—092.9:616—003.725:547.466.3

Т.М.Мишуніна, В.Я.Кононенко, О.С.Мікоша, М.Д.Тронько

Деякі параметри ГАМК-ергічної системи кори надниркових залоз тварин у нормі та за умов стимуляції стероїдогенезу

Исследовали активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК), фермента синтеза ГАМК, и интенсивность ее рецептирования в коре надпочечников и гипоталамусе морских свинок и крыс в норме и в условиях стимуляции стероидогенеза. Показано, что в коре надпочечников присутствуют метаболическая система, которая обеспечивает синтез ГАМК из глутамата, и механизмы рецепции ГАМК плазматическими мембранами. Синтез медиатора в коре надпочечников подвержен сезонным изменениям, синтез ГАМК и ее рецепция избирательно изменяются при введении АКТГ, пролактин и содержания животных на диете с избытком ионов калия.

Вступ

В організмі ссавців поза центральної нервової системи ГАМК-ергічні клітини наявні поміж нейронів симпатичної та парасимпатичної систем, клітин залоз внутрішньої та зовнішньої секреції. Серед функцій ГАМК на периферії відзначають нейромедіаторну (наприклад, у кишковому сплетінні, симпатичних гангліях, в інервації сечового та жовчного міхурів), модуляторну щодо ендокринної та екзокринної функцій (наприклад, в яєчниках, підшлунковій залозі, шлунку), а також участь ГАМК як медіатора трофічних (морфогенних) контактів [9]. За механізмом дії ефекти ГАМК об'єднують у три групи: швидкі мембранні, більш повільні мор-

фогенні процеси (опосередковані рецепторами ГАМК) та ефекти, в яких ГАМК безпосередньо регулює внутрішньоклітинні процеси без участі мембранних рецепторів. Вивченню можливих функцій ГАМК в ендокринних залозах приділяється останнім часом все більша увага. Досліджується вплив ГАМК на секрецію інсуліну, соматостатину і глюкагону острівками Лангерганса підшлункової залози, роль у цих процесах ГАМК-рецепторів [12], можлива участь медіатора в синтезі тиреоїдних гормонів у щитовидній залозі [11], залучення його до механізмів, що регулюють секрецію гормонів у плаценті [16] та ін. Стосовно мозкового шару надниркових залоз, то в хромафінних клітинах присутні всі функціональні ланки ГАМК-ергічної системи — сама ГАМК, ферменти її синтезу й перетворення, механізми вивільнення і поглинання ГАМК, усі типи ГАМК-рецепторів [17]. Виявлено і з'ясовується значення Ca^{2+} -залежного і Ca^{2+} -незалежного вивільнення ГАМК [21] і, навпроти, опосередкованого ГАМК-рецепторами транспорту Ca^{2+} — у хромафінних клітинах надниркових залоз [18]. Подібні дослідження тільки розпочато, однак уже зараз зрозуміло, що ГАМК приймає участь у регуляції вивільнення хромафінними клітинами не лише катехоламінів, а й інших біологічно активних речовин, наприклад пептидів [21]. Питання про обмін, транспорт і рецепцію ГАМК у корі надниркових залоз залишається невивченим і немає достатніх доказів можливого значення периферичної ГАМК у регуляції функції кори надниркових залоз. Раніше нами були обстежені хворі із гіперкортицизмом, у яких відмічено зниження рівня АКТГ у крові після одноразового прийому фенібуту, що було пов'язано з різким збільшенням вмісту кортизолу [4]. Можливо, в цьому ефекті фенільного похідного ГАМК певну роль відіграє ГАМК-ергічна система клітин кори надниркових залоз. У експериментальних та клінічних дослідженнях по вивченню впливу вальпроату натрію на стан гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи також висловлювалося припущення про те, що дія цього інгібітора може здійснюватися не тільки на рівні гіпоталамуса, але й периферично [15, 20].

Метою нашої роботи було дослідження активності ферменту синтезу ГАМК — глутаматдекарбоксилази (ГДК) у тканині кори і специфічне зв'язування ^{14}C -ГАМК плазматичними мембранами кори надниркових залоз морських свинок у нормі та за умов стимуляції стероїдогенезу. Ці показники досліджували також у гіпоталамусі тварин.

Методика

Досліди провадили на морських свинках-самцях масою 350—400 г. У першій серії експериментів морським свинкам внутрішньом'язово двічі на добу протягом 3-х діб вводили суспензію цинк-кортикотропіну (2,5 од/1000 г). Тварин забивали через 18 год після останнього введення гормону. У другій серії тваринам внутрішньом'язово раз на добу протягом 3-х діб вводили пролактин (20 од/100 г). Тварин забивали через 24 год після останнього введення. У дослідах використано гормональні препарати Каунаського заводу ендокринних препаратів (Литва). Контрольним морським свинкам вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. У третій серії морські свинки протягом 5-ти діб знаходилися на стандартному раціоні віварію з додаванням до овочевого раціону хлористого калію в розрахунку 250 ммоль K^+ /кг їжі. Контролем у цій серії були інтактні тварини. Досліджували також тканини інтактних щурів.

Надниркові залози морських свинок розрізали навпіл і звільняли від мозкової частини за допомогою тупого скальпеля. Гомогенати кори надниркових залоз і гіпоталамуса, приготовлені на 0,32 моль/л розчині сахарози, центрифугували при $2,5 \cdot 10^3$ об/хв протягом 10 хв; ядерну фракцію відкидали, а до супернатанта додавали дистильовану воду (20 об'ємів до вихідної наважки). Проби заморожували для звільнення мембран від речовин, що інгібують зв'язування ^{14}C -ГАМК *in vitro* [5], після відтавання їх центрифугували при 40 000 г протягом 20 хв при 4°C. Осад тричі промивали трис-цитратним буфером (50 ммоль/л, pH 7,4) і зберігали при -20°C. Перед використанням мембрани суспензували в свіжому трис-цитратному буфері. Кінцева концентрація білка становила 2—3 мг/мл.

Для визначення зв'язування ^{14}C -ГАМК плазматичними мембранами аліквоту суспензії (приблизно 250 мкг білка) інкубували 15 хв (для гіпоталамуса) і 30 хв (для кори надниркових залоз) при 0°C у трис-цитратному буфері (50 ммоль/л) з $25 \cdot 10^{-12}$ моль ^{14}C -ГАМК (фірма «Amersham», Великобританія, питома радіоактивність $7,40 \cdot 10^9$ Бк/ммоль у пластикових пробірках (P8) фірми «Beckman» (США). Реакцію зупиняли центрифугуванням проб при 40 000 г протягом 20 хв; до осаду приливали сцинтиляційну рідину ЖС-8. Підрахунок радіоактивності проводили на рідинному сцинтиляційному лічильнику LS 5000ТА фірми «Beckman» (США). Специфічне зв'язування ^{14}C -ГАМК встановлювали як різницю між загальним (у відсутності) та неспецифічним (у присутності 10^{-3} моль неміченої ГАМК) зв'язуванням. Кількість ^{14}C -ГАМК, що зв'язалася, виражали в $1 \cdot 10^{-12}$ моль/г білка мембран.

Активність ГДК визначали у гомогенаті тканин морських свинок та щурів за допомогою флуориметричного методу [13]. Визначення вмісту білка в пробах проводили за методом Lowry [14]; вміст сумарних 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові встановлювали за De Moorge [1]. Отримані результати обробляли статистично із застосуванням критерію t Стюдента, коефіцієнт кореляції розраховували за методом кореляції рангів [2].

Результати та їх обговорення

Як показали проведені дослідження, активність ГДК визначається в тканині надниркових залоз щурів та корі наднирників морських свинок, що вказує на присутність у надниркових залозах і, зокрема, в їх корковій речовині метаболічної системи утворення ГАМК із глутамату. Активність ГДК у тканині надниркових залоз щурів і в корі надниркових залоз морських свинок нижча, ніж у гіпоталамусі цих тварин (табл. 1). При цьому нами було виявлено, що активність ферменту в гіпоталамусі та надниркових залозах щурів і морських свинок у зимовий період року істотно відрізняється від такої весною (див. табл. 1). У гіпоталамусі тварин ак-

Таблиця 1. Активність глутаматдекарбоксилази (ГАМК, мкмоль/100 мг білка за 1 год) у надниркових залозах та гіпоталамусі морських свинок і щурів залежно від сезону ($M \pm m$, $n=6$)

Об'єкт дослідження	Морські свинки		Щури	
	Зима	Весна	Зима	Весна
Кора надниркових залоз	4,89±0,39	9,10±0,76*	...	...
Надниркові залози	...	...	10,3±2,4	20,0±3,2*
Гіпоталамус	36,1±2,6	24,9±1,2*	103,9±12,7	35,6±3,5*

* $P < 0,05$ відносно групи тварин, обстеженої взимку.

тивність ГДК зимою вища, факт сезонних модуляцій активності ГДК у мозку тварин встановлено раніше [6, 7] і пояснюється змінами функціональної активності системи гальмівного медіатора в ЦНС протягом року. У той же час у надниркових залозах нами вперше відзначено сезонні зміни активності ГДК, причому напрямок їх був протилежний напрямку зрушень активності ферменту у гіпоталамусі: активність ГДК у надниркових залозах весною в 1,8—2,0 рази вища, ніж зимою. У результаті співвідношення між активністю ГДК у гіпоталамусі та надниркових залозах весною стають менш значними: зимою активність ГДК у гіпоталамусі щурів перевищувала таку в надниркових залозах у 10 разів, весною — в 1,8 рази; для морських свинок ці співвідношення становили 7,0 та 2,7 рази відповідно.

Стимуляцію процесів стероїдогенезу в тканині кори надниркових залоз морських свинок моделювали різними методами: введенням основного регулятора синтезу глюкокортикоїдів — АКТГ, введенням пролактину, одного з факторів, які активують синтез гормонів кори надниркових залоз [22], і утримуванням тварин на дієті з підвищеною концентрацією іонів калію — це призводить до відносно вибіркової активації синтезу альдостерону [8]. Характеризуючи моделі дослідження потрібно відмітити, що введення АКТГ значно збільшувало відносну масу коркового шару надниркових залоз морських свинок, вміст білка в ньому, а також рівень сумарних 11-ОКС у плазмі крові. Ефект пролактину виявився значно нижчим (табл. 2). Результати, таким чином, свідчать про стимуляцію процесів стероїдогенезу в корі надниркових залоз морських свинок при введенні застосованих гормонів гіпофіза, однак ступінь стимуляції в наших дослідах при введенні пролактину була значно менша, ніж при введенні АКТГ. Утримування морських свинок на дієті з підвищеним вмістом іонів калію призводило до помітного збільшення лише концентрації сумарних 11-ОКС у плазмі крові, тоді як відносна маса кори надниркових залоз та рівень білка в ній не змінювалися. Підвищення концентрації 11-ОКС пов'язано в цих дослідах, напевно, з виникненням незначного хімічного стресу.

Таблиця 2. Відносна маса коркової речовини надниркових залоз (мг/100 г), вміст білка в ній (мг/100 мг тканини) та концентрація 11-ОКС (мкг/100 мл) у плазмі крові морських свинок при введенні АКТГ, пролактину та надлишку в їжі іонів калію ($M \pm m$, $n=6$)

Умови досліджу	Коркова речовина				Плазма крові	
	відносна маса		вміст білка		вміст 11-ОКС	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
Введення АКТГ	0,23 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,01*	13,4 $\pm$ 0,3	16,2 $\pm$ 0,3*	46,7 $\pm$ 4,6	103,0 $\pm$ 15,1*
Введення пролактину	0,27 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,05*	18,2 $\pm$ 0,7	18,8 $\pm$ 0,4	63,8 $\pm$ 4,2	108,9 $\pm$ 14,7*
Введення в їжу надлишку іонів калію	0,28 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,03	16,0 $\pm$ 0,77	15,1 $\pm$ 0,81	65,0 $\pm$ 5,65	85,1 $\pm$ 5,89*

Примітка. Тут і в табл. 3 і 4 * $P < 0,05$.

При введенні АКТГ і пролактину активність ГДК у корковій речовині надниркових залоз виявилась зниженою; в гіпоталамусі вона збільшувалася при введенні пролактину і не змінювалася при введенні АКТГ (табл. 3). Співставляючи отримані результати, потрібно, перш за все, відзначити однак направлені зміни активності ферменту синтезу ГАМК у корі надниркових залоз при введенні обох гормонів. У гіпоталамусі зміни активності ГДК виявлено лише при введенні пролактину, що підтверджує існування ГАМК-ергічних механізмів у короткому зворотному зв'язку на рівні тубероінфундибулярних нейронів, за допомогою якого пролактин регулює власну секрецію [10, 19]. Відсутність ефекту АКТГ на активність ГДК у

Таблиця 3. Активність глутаматдекарбоксилази (ГАМК, мкмоль/100 мг білка за 1 год) в корі надниркових залоз та гіпоталамусі морських свинок при введенні АКТГ, пролактину та надлишку іонів калію ($M \pm m$; $n=6$)

Умови досліджу	Кора надниркових залоз		Гіпоталамус	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Введення АКТГ	4,89 $\pm$ 0,39	2,54 $\pm$ 0,28*	36,1 $\pm$ 2,6	34,2 $\pm$ 5,4
Введення пролактину	9,10 $\pm$ 0,67	6,30 $\pm$ 0,77*	24,9 $\pm$ 1,2	33,0 $\pm$ 1,5*
Введення надлишку іонів калію	9,25 $\pm$ 1,0	14,1 $\pm$ 1,95*	36,4 $\pm$ 4,1	33,2 $\pm$ 5,1

гіпоталамусі морських свинок узгоджується з показаним раніше при одно-разовому чи багаторазовому введенні АКТГ щурам [3]. Отже, зміни інтенсивності синтезу ГАМК у корі надниркових залоз пов'язані зі зміною інтенсивності процесів стероїдогенезу. Це підтверджують дані про наявність негативного корелятивного зв'язку між активністю ГДК у корі надниркових залоз та концентрацією 11-ОКС у плазмі крові тварин ($r=-0,65$ та $r=-0,62$ при введенні АКТГ і пролактину відповідно, $P<0,05$).

Введення АКТГ і пролактину призводило до істотного зниження рівня специфічного зв'язування ^{14}C -ГАМК плазматичними мембранами кори надниркових залоз (табл. 4); ефект пролактину при цьому був більш значним. Рецепція ^{14}C -ГАМК мембранами гіпоталамуса істотно не змінювалася, проте було виявлено негативний корелятивний зв'язок між рівнем зв'язування медіатора в гіпоталамусі і концентрацією 11-ОКС у плазмі крові ($r=-0,65$ та $r=-0,42$ при введенні АКТГ і пролактину відповідно, $P<0,05$). Отже, отримані результати свідчать про вплив АКТГ і пролактину на процеси рецепції ГАМК у корі надниркових залоз.

Таблиця 4. Специфічне зв'язування ^{14}C -ГАМК (10^{-12} моль/г білка) плазматичними мембранами коркової речовини надниркових залоз та гіпоталамуса морських свинок при введенні АКТГ, пролактину та надлишку іонів калію ($M \pm m$; $n=6$)

Умови досліджу	Кора надниркових залоз		Гіпоталамус	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Введення АКТГ	4,79 $\pm$ 1,07	2,61 $\pm$ 0,85*	3,13 $\pm$ 0,34	2,68 $\pm$ 0,85
Введення пролактину	4,79 $\pm$ 1,07	1,78 $\pm$ 0,33*	3,13 $\pm$ 0,34	2,42 $\pm$ 0,23
Введення надлишку іонів калію	3,34 $\pm$ 0,67	3,99 $\pm$ 0,84	—	—

За умов утримування морських свинок на дієті з підвищеним вмістом іонів калію (при передбачуваному збільшенні рівня альдостерону в організмі) встановлено підвищення активності ГДК у корі надниркових залоз (див. табл. 3) та позитивний кореляційний зв'язок між активністю фермента в ній та концентрацією 11-ОКС у крові ($r=+0,65$; $P<0,05$); істотних змін рецепторного зв'язування медіатора в корі надниркових залоз морських свинок не виявлено (див. табл. 4). Трактуючи ціх результатів представляє зараз певну складність, однак інший характер змін інтенсивності синтезу ГАМК та його зв'язку з рівнем гормонів у крові в цій серії дослідів (встановлена статистично значима різниця між коефіцієнтами кореляції в групах із введенням АКТГ або пролактину та в групі з утриманням тварин на дієті з надлишком іонів калію — застосовано перетворення Фішера [2]) передбачає, можливо, й інші шляхи участі ГАМК у механізмах регуляції синтезу і секреції мінералокортикоїдів, порівняно з глюкокортикоїдами.

Виконані дослідження дозволяють зробити висновок, що в корі надниркових залоз морських свинок присутні метаболічна система, яка забезпечує синтез ГАМК із глутамату, та механізми рецепції ГАМК плазматичними

мембранами клітин. Синтез медіатору у корі надниркових залоз підлягає сезонним модуляціям, синтез ГАМК та її рецепція вибірково змінюються за умов стимуляції стероїдогенезу. З'ясування механізмів участі периферичної ГАМК-ергічної системи в модуляції функції надниркових залоз потребують подальшого дослідження.

T.M.Mishunina, V.Ya.Kononenko, A.S.Mikosha, N.D.Trunko

SOME PARAMETERS OF THE ADRENOCORTICAL GABA-ERGIC SYSTEM IN ANIMALS WITH NORMAL AND STIMULATED STEROIDOGENESIS

Activity of glutamate decarboxylase, a GABA synthesis enzyme, and intensity of its reception in the adrenal cortex and hypothalamus of guinea pigs and rats with normal and stimulated steroidogenesis was investigated. It has been shown that in the adrenal cortex there is a metabolic system which provides GABA synthesis from glutamate and mechanisms of GABA reception by plasmatic membranes. Mediator synthesis in the adrenal cortex is subjected to seasonal changes, GABA synthesis and reception selectively vary with administration of ACTH, prolactin and maintenance of animals on a diet with an excess of potassium ions.

V.P.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашиов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. — 1990. — 76, № 2. — С. 280—283.
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
3. Мишунина Т.М., Кононенко В.Я. Гормональный контроль обмена гамма-аминомасляной кислоты в гипоталамусе и гиппокампе крыс // Укр. биохим. журн. — 1990. — 62, № 6. — С. 71—79.
4. Мишунина Т.М., Кононенко В.Я., Комиссаренко И.В. Влияние ГАМК-ергических препаратов на функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у больных болезнью Иценко-Кушинга // Пробл. эндокринологии. — 1991. — 37, № 4. — С. 28—31.
5. Парфенова Е.В. Эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов постсинаптических мембран // Нейрохимия. — 1986. — 5, № 1. — С. 61—73.
6. Розанов В.А. Сезонные изменения в системе ГАМК головного мозга мышей // Укр. биохим. журн. — 1982. — 54, № 3. — С. 36—40.
7. Al-Badry R., Taha H. Hibernation hypothermia and metabolism in hedgehogs — changes in free amino acids and release compounds // Comp. Biochem. and Physiol. — 1982. — 72, № 3. — P. 541—547.
8. Boyd J., Palmore W.P., Mulrow P. Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat // Endocrinology. — 1971. — 88, № 36. — P. 556—565.
9. Erdo L., Wolf J. α -Aminobutyric acid outside the mammalian brain // J.Neurochem. — 1990. — 54, № 2. — P. 363—372.
10. Felman K., Tappaz M. Feedback of prolactin on median eminence: Differential effects on gaba and dopamine release // Neuroendocrinology. — 1990. — 52, Suppl. № 1. — P. 161.
11. Gebauer H. Untersuchungen über Anreicherung, Stoffwechsel und Wirkung von α -aminobutter saure (GABA) in der Schilddrüse // Zool. Jahrb. Abt. allg. Zool. und Physiol. Tiere. — 1974. — 78, № 4. — P. 547—559.
12. Gilon P., Bertrand G. The influence of α -aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas // Endocrinology. — 1991. — 129, № 5. — P. 2521—2529.
13. Graham I., Aprison M. Distribution of some enzymes associated with the metabolism of glutamine in rat spinal cord // J.Neurochem. — 1969. — 16, № 4. — P. 559—566.
14. Hartree T. Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — 48, № 2. — P. 422—427.
15. Jones M., Gillham B., Altaher A. et al. Clinical and experimental studies in the role of GABA in the regulation of ACTH secretion // Neuropharmacology-Ser. B. — 1984. — 23, № 7. — P. 833—834.
16. Kaplan L., Lopez Costa J.J., Carbone S.E. et al. Neurotransmitters in human term placenta: Biochemistry and immunochemistry // Placenta. — 1989. — 10, № 5. — P. 502—503.
17. Kataoka Y., Gutman Y., Guidotti A. et al. Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. — 1984. — 81, № 10. — P. 3218—3222.