

нервной системы у обоих сибсов), клинической картины (лейкодистрофия, периферическая полинейропатия, симптомы аддисонизма), прогрессивного течения патологии, клинко-генеалогического исследования, данных биохимических и гормональных исследований, ядерной магнитно-резонансной томографии был поставлен диагноз: пероксисомная болезнь — АД с X-сцепленным рецессивным типом наследования. У младшего сибса была установлена церебральная форма патологии, у старшего заболевание протекало в виде АМНП.

Особенностью данного случая явились поражение бронхолегочной и иммунной системы у обоих сибсов, предшествовавшее появлению основных признаков заболевания, вторичный дефект транспорта электролитов в эндокринных железах; опережение физического и полового развития; последнее, возможно, обусловлено вовлечением в патологический процесс гипоталамо-гипофизарной системы. Заслуживают внимания особенности родословной: фенотипические признаки носительства мутантного гена у бабки по материнской линии и у ее сестры, а также изолированная надпочечниковая недостаточность у брата матери.

Для своевременного распознавания АД во всех случаях выявленного у мальчиков гипокортицизма целесообразно проведение детального соматогенетического и клинко-генеалогического исследования, компьютерной магнитно-резонансной томографии головного мозга и надпочечников, опреде-

ление уровня длинноцепочечных жирных кислот. Учитывая инкурабельность АД, огромное значение приобретает правильная оценка генетического риска для сибсов, т. е. прогноз потомства [8]. Картирование мутантного гена позволяет надеяться в будущем на уточнение диагноза и проведение пренатальной диагностики с помощью молекулярно-генетических методов исследования, а также на появление эффективных методов лечения этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян О. В. Детская неврология. — М., 1986. — С. 412—413.
2. Гречанина В. Я., Песочина Э. А., Здыбская Е. П. и др. // Ультразвук. перинатальная диагн. — 1994. — № 4—5. — С. 72—77.
3. Жуковский М. А. Детская эндокринология. — М., 1995. — С. 33—35, С. 314—320, С. 331—338.
4. Калина Л. В., Гусев Е. И. Наследственные болезни метаболизма и факоматозы. — М., 1981. — С. 33—35.
5. Мельниченко Г. А., Фадеев В. В., Бузиашвили И. И. // Пробл. эндокринол. — 1998. — № 4. — С. 46—55.
6. Наследственные болезни нервной системы: Руководство для врачей / Под ред. Ю. Е. Вельтишева, П. А. Темина. — М., 1998. — С. 478—479.
7. Хохлов А. П., Савченко Ю. Н. Миелинопатии и демиелизирующие заболевания нервной системы. — М., 1990.
8. Assies J., Wanders R. J. A., Barth P. G. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. — 1997. — Vol. 63. — P. 4—14.
9. Laureti S., Casucci G., Santeusano F. et al. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1996. — Vol. 28. — P. 319—322.

Поступила 27.09.99

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© Т. М. МИШУНИНА, В. Я. КОНОНЕНКО, 2001

УДК 616.45-02:613.863]-092.9

Т. М. Мишунина, В. Я. Кононенко

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ГАМК В НАДПОЧЕЧНИКАХ И СОДЕРЖАНИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В КРОВИ ПРИ СТРЕССЕ У ИНТАКТНЫХ КРЫС И КРЫС С ИЗМЕНЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ СИСТЕМЫ

Лаборатория нейрехимии (руководитель — проф. В. Я. Кононенко) Института эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, Киев

Плавание крыс в течение 30 мин приводило к снижению уровня специфического связывания ГАМК плазматическими мембранами надпочечников интактных крыс, но не крыс, которым многократно вводили гидрокортизон с целью торможения базальной активности системы гипоталамус—гипофиз—кора надпочечников и у которых уровень рецептирования аминокислоты был значительно выше контроля. Предваряющее стресс введение баклофена и гамма-L-аминобутирил-таурина не изменяло специфическое связывание ГАМК, несмотря на влияние препаратов на концентрацию кортикостероидов в крови животных.

Thirty-minutes swimming of rats led to a decrease of specific GABA binding by adrenal plasmatic membranes in intact rats but not in rats with increased level of amino acid reception repeatedly injected with hydrocortisone for inhibition of basal hypothalamic-pituitary-adrenal activity. Injections of baclophene and gamma-L-aminobutyryl-taurine before stress did not modify the specific GABA binding, although the drugs changed the corticosteroid concentrations in the blood.

Среди экстранейрональных функций гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в последнее время все большее внимание уделяется выяснению возможной ее роли непосредственно в эндокринных железах. Так, исследуются роль ГАМК-рецепторов в регуляции секреции инсули-

на, соматостатина и глюкагона поджелудочной железы [15], участие ГАМК в синтезе тиреоидных гормонов в щитовидной железе [14], вовлечение медиатора в механизмы, регулирующие секрецию гормонов в плаценте [18], надпочечниках [4, 5, 11].

Таблица 1

Относительная масса надпочечников и концентрация 11-ОКС в плазме крови после окончания плавания у интактных крыс, у крыс, которым длительно вводили гидрокортизон, и у крыс, которым перед плаванием вводили фармакологические препараты ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Число животных	Относительная масса, мг/100 г массы тела	Концентрация 11-ОКС, нмоль/л
Интактный контроль	9	$0,17 \pm 0,015$	$607,3 \pm 46,8$
Стресс	9	$0,18 \pm 0,011$	$886,3 \pm 59,9^*$
Баклофен + стресс	5	—	$591,3 \pm 18,9^{***}$
ГАМК-таурин + стресс	14	—	$804,6 \pm 44,1$
Физиологический раствор	7	$0,16 \pm 0,016$	$700,7 \pm 61,2$
Гидрокортизон	7	$0,10 \pm 0,005^*$	$277,9 \pm 24,0^*$
Гидрокортизон + стресс	9	$0,11 \pm 0,007$	$396,6 \pm 32,0^{**}$
Гидрокортизон + баклофен + стресс	8	—	$299,2 \pm 22,2^{***}$
Гидрокортизон + ГАМК-таурин + стресс	7	—	$279,4 \pm 28,5^{***}$

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий: одна — с соответствующим контролем; две — с животными, которым многократно вводили гидрокортизон; три — со стрессированными животными.

В отношении последних показано, что в мозговом слое железы присутствуют все компоненты ГАМКергической системы [19]; предполагают, что ГАМК принимает участие в регуляции секреции хромаффинными клетками не только катехоламинов, но и иных биологически активных веществ, в частности пептидов [13, 22]. В коре надпочечников также определяется активность фермента синтеза этой аминокислоты — глутаматдекарбоксилазы, кроме того, ГАМК специфически связывается с плазматическими мембранами. Активность глутаматдекарбоксилазы в коре надпочечников (как и в мозге) зависит от времени года; синтез и рецепция ГАМК избирательно изменяются в условиях гормональной модификации интенсивности стероидогенеза [4, 5]. В то же время не известно участие ГАМК, в частности ее рецепторов, в механизмах модуляции секреции гормонов надпочечников вследствие стрессорного фактора. Особый интерес представляют такие данные в условиях развития стресс-реакции на фоне нарушенной функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), так как одним из аллостерических модуляторов ГАМК-рецепторов является ингибитор связывания диазепама, важная роль которого в опосредовании влияния гормонов на стероидогенез в настоящее время широко обсуждается [26].

Целью работы было исследовать в условиях стресса специфическое связывание ГАМК плазматическими мембранами надпочечников интактных крыс и крыс, которым либо длительное время вводили гидрокортизон, либо на его фоне до стресса вводили ГАМКергические препараты, оказывающие влияние на функциональную активность ГГНС, — агонист ГАМК_B-рецепторов баклофен [21] и новый ГАМК-содержащий пептид гамма-L-аминобутирилтаурин [3].

Материалы и методы

Опыты проведены на самцах крыс линии Вистар массой 160—200 г. С целью торможения функции

ГГНС животным ежедневно (утром) в течение 10 дней вводили гидрокортизон ("Gedeon Richter", Венгрия) в дозе 35 мг на 1 кг массы тела. Крыс брали в опыт через 6 дней после последней инъекции гормона.

Контролем служили животные, которым в соответствующем объеме на протяжении 10 дней вводили физиологический раствор. Стресс моделировали, принуждая крыс плавать в течение 30 мин в теплой воде ($32 \pm 2^\circ\text{C}$). Части подопытных животных за 30 мин до начала плавания внутривенно вводили баклофен ("Polfa", Польша) или гамма-L-аминобутирилтаурин (ГАМК-таурин, Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины) в дозе 10 мг на 1 кг массы тела. Крыс декапитировали сразу после окончания плавания.

Получение плазматических мембран из ткани надпочечников, определение специфического связывания ^{14}C -ГАМК и уровня суммарных 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови проводили, как описано ранее [4].

Результаты и их обсуждение

Плавание на протяжении 30 мин приводило к повышению уровня кортикостероидов в крови интактных крыс (табл. 1). Коэффициент интенсивности стресс-реакции составил 1,60, что характеризует использованную модель как модель умеренного стресса [6]. Введение перед плаванием баклофена (но не ГАМК-таурина) предупреждало развитие гормональной реакции коры надпочечников на стресс. Этот эффект агониста ГАМК_B-рецепторов подтверждает данные литературы о предупреждении баклофеном повышения концентрации адренотропного гормона (АКТГ) у крыс в условиях стимуляции латеральной зоны миндалины или вестибулярного стресса [21], а также стимулированного инсулиновой гипогликемией кортизола у людей [23].

Через 6 дней после отмены гидрокортизона при 10-дневном его введении наблюдали снижение относительной массы надпочечников и существенное уменьшение уровня 11-ОКС в плазме крови крыс (см. табл. 1). Ранее установлено, что в эти сроки концентрация кортикостероидов в периферической крови была даже несколько меньше, чем через 1 сут после последней инъекции гормона [5]. Сниженный уровень 11-ОКС в крови крыс связан с торможением функции ГГНС на уровне центральных и периферического звеньев [9] и с полным выведением экзогенного гормона из организма животных.

На фоне торможения функции ГГНС плавание крыс вызывало определенное повышение уровня 11-ОКС в плазме крови (см. табл. 1). Считают, что торможение функции ГГНС (снижение уровня АКТГ и 11-ОКС, а также индукции повышения их концентрации после стресса) наблюдается в течение нескольких недель после последнего введения гидрокортизона [9]. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что уже на 7-й день после отмены гормона может наблюдаться частичное восстановление гормональной стрессовой реакции, вероятно, в основном за счет нормализации функционирования периферического звена ГГНС. Так, показано, что у крыс, 10 дней получавших

Специфическое связывание ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами надпочечников после окончания плавания у интактных крыс, у крыс, которым длительно вводили гидрокортизон, и у крыс, которым перед плаванием вводили фармакологические препараты ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Число животных	Связывание ^{14}C -ГАМК, пмоль ^{14}C -ГАМК/мг белка
Интактный контроль	5	$22,0 \pm 3,22$
Стресс	7	$13,5 \pm 1,76^*$
Баклофен + стресс	5	$12,9 \pm 1,38$
ГАМК-таурин + стресс	5	$17,6 \pm 2,74$
Физиологический раствор	7	$22,9 \pm 3,70$
Гидрокортизон	7	$72,3 \pm 13,4^*$
Гидрокортизон + стресс	9	$70,5 \pm 6,36$
Гидрокортизон + баклофен + стресс	8	$54,3 \pm 6,66$
Гидрокортизон + ГАМК-таурин + стресс	7	$85,6 \pm 6,44$

инъекции гидрокортизона, резервные возможности коры надпочечников при стимуляции АКТГ оставались весьма значительными [8], а в надпочечниках крыс, которым до начала плавания с грузом несколько раз вводили дексаметазон, содержание кортикостерона повышалось в той же мере, что и у интактных [2]. Сохранение определенной реакции коры надпочечников на длительную иммобилизацию (повышение концентрации 11-ОКС в крови и гипертрофия надпочечников) имело место даже у гипопитуитаризированных крыс [1], что позволило автору сделать заключение о том, что, во-первых, секреторные клетки надпочечников вплоть до терминального состояния сохраняют свою специфическую активность, а во-вторых, их функция регулируется, помимо основных, и парагипофизарными механизмами.

Кроме того, выяснено, что стресс у крыс после длительного введения гидрокортизона сопровождается повышением в крови уровня вазопрессина [10], который, как известно, также является секретогеном для кортикостероидов [24]. В экспериментах с использованием стрессового раздражения на фоне действия предыдущих стрессов показано увеличение в срединном возвышении гипоталамуса концентрации вазопрессина, но не КРФ [25], а гипопиз крыс в условиях неоднократного повышения уровня кортикостероидов вследствие повторяющихся стрессовых ситуаций становится гиперчувствительным к влиянию вазопрессина [16]. Существует также некоторая специфика влияния различных стрессоров: плавание сопровождается усилением высвобождения вазопрессина в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса, тогда как эмоциональный стресс — только в первом [27].

Введение обоих исследованных ГАМКергических препаратов до плавания крысам, которым многократно вводили гидрокортизон, полностью предотвращало небольшое стрессорное повышение уровня 11-ОКС в крови (см. табл. 1). Таким образом, в условиях торможения функции ГГНС проявляется действие не только баклофена, но и ГАМК-таурина, который у интактных крыс при стрессе не влиял на содержание кортикостероидов в крови.

Исследование специфического связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами надпочечников крыс показало, что стрессирование интактных крыс приводило к снижению уровня рецептирования аминокислоты (табл. 2). Следовательно, активация процессов стероидогенеза вследствие воздействия стресса (см. табл. 2), 4-кратного введения АКТГ крысам [5], 6-кратного введения АКТГ или 3-кратного введения пролактина морским свинкам [4] сопровождается односторонними изменениями рецептирования ГАМК в надпочечниках или коре надпочечников. Как установлено в двух последних случаях, активность фермента синтеза аминокислоты также была ниже, чем в контроле. Возможно, снижение синтеза и рецептирования ГАМК в надпочечниках способствует снятию тормозного контроля процессов стероидогенеза со стороны медиатора в условиях воздействия стимулирующих этот процесс факторов, если предположить, что такой механизм регу-

ляции на уровне секреторных клеток коры надпочечников существует.

У крыс через 6 дней после прекращения введения гидрокортизона специфическое связывание ГАМК плазматическими мембранами надпочечников было резко увеличено (см. табл. 2). Это подтверждают данные исследований, проведенных нами ранее, где, в частности, было показано, что интенсивность рецептирования аминокислоты повышена через 1 сут после последней инъекции гормона; она прогрессивно повышается в период отмены гормона, т. е. в условиях недостатка как АКТГ, так и кортикостероидов. Можно предположить, что увеличение рецептирования ГАМК плазматическими мембранами надпочечников связано не с влиянием экзогенных (для клеток надпочечников) кортикостероидов, а с недостатком в условиях торможения функции ГГНС основного стимулятора стероидогенеза — АКТГ. В этом плане необходимо отметить, что интенсивность связывания ГАМК увеличена также и во внеопухолевой ткани коры надпочечников больных с синдромом Иценко—Кушинга, которая находится под постоянным воздействием избытка кортикостероидов [5]. Однако, как свидетельствуют данные литературы, в случае присутствия гормонально-активной опухоли внеопухолевая ткань коры надпочечников относительно автономна в отношении центральной и периферической регуляции ее функции [7].

Плавание крыс, многократно получавших гидрокортизон, несмотря на некоторое стрессорное повышение уровня кортикостероидов в организме, не изменяло специфическое связывание ГАМК плазматическими мембранами надпочечников (см. табл. 2). Этот факт с учетом данных литературы о длительном торможении кортикотропной функции аденогипофиза [9] может свидетельствовать в пользу высказанного выше предположения о роли АКТГ в регуляции процессов рецепции ГАМК, а также о нарушении в условиях патологии надпочечников внутриклеточной чувствительности собственным рецепторам аминокислоты [5].

Введение перед стрессом баклофена интактным крысам, а ГАМК-таурина как интактным животным, так и крысам, которым многократно вводили гидрокортизон, не изменяло специфическое свя-

зывание ГАМК плазматическими мембранами надпочечников (см. табл. 2). В то же время введение баклофена перед стрессированием крысам, которым многократно вводили гидрокортизон, несколько снижало уровень рецепции ГАМК в надпочечниках ($0,1 > p > 0,05$). По-видимому, действие препаратов на интенсивность секреции кортикостероидов в условиях стресса у интактных животных и у крыс в условиях гормонального торможения ГНС связано в большей мере с их влиянием на уровне центральных звеньев регуляции. В этом плане следует отметить, что ГАМК принимает участие в контроле синтеза и высвобождения как КРФ, так и вазопрессина [17], причем для изменения секреции последнего существенным является активность не только ГАМК_A-рецепторов [12], но и ГАМК_B-рецепторов мозга [20].

Заключение

Следовательно, полученные данные могут свидетельствовать о существовании функциональной связи между состоянием ГАМК-рецепторов надпочечников и изменениями как интенсивности процессов стероидогенеза, так и механизмов регуляции последнего.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова Т. И. Морфофункциональные изменения в коре надпочечных желез при стрессе в условиях гипопитуитаризма и предварительного введения АКТГ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1983.
2. Виру А. А. // Бюл. exper. биол. — 1976. — Т. 82, № 7. — С. 774—776.
3. Кононенко В. Я., Шилин В. В., Мишунина Т. М. и др. // Доповід НАН України. — 1999. — № 9. — С. 160—164.
4. Мишунина Т. М., Кононенко В. Я., Микоша О. С., Тронько М. Д. // Физиол. журн. — 1994. — Т. 39, № 3—4. — С. 8—13.
5. Мишунина Т. М., Кононенко В. Я., Рибак С. И. // Эндокринология. — 2000. — Т. 5, № 1. — С. 16—21.

6. Пищенко М. Г., Голубева Л. Ю., Кузнецова Б. А. и др. // Бюл. exper. биол. — 1996. — Т. 122, № 8. — С. 156—159.
7. Синдром Иценко—Кушинга / Под ред. В. Г. Баранова, А. И. Нечая. — Л., 1988.
8. Султанов Ф. Ф., Стефановская Н. В. // Пат. физиол. — 1974. — № 3. — С. 72—74.
9. Филаретов А. А., Богданов А. Т., Ярушкіна Н. И. // Физиол. журн. — 1995. — Т. 81, № 2. — С. 40—46, 57.
10. Филаретова Л. П., Подвикина Т. Т., Балашов Ю. Г., Филаретов А. А. // Физиол. журн. СССР. — 1989. — Т. 75, № 7. — С. 980—985.
11. Busik J., Nakamura M., Abe Y. et al. // Brain Res. — 1996. — Vol. 739, N 1—2. — P. 97—103.
12. Fenellon V., Herbison A. // Mol. Brain Res. — 1995. — Vol. 34, N 1. — P. 45—56.
13. Fujimoto M., Kataoka Y., Guidotti A., Hanbauer I. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1987. — Vol. 243, N 1. — P. 195—199.
14. Gebauer H., Pabst M. // Cell Tiss. Res. — 1981. — Vol. 220, N 4. — P. 873—879.
15. Gilon P., Bertrand G., Loubatieres-Mariani M. et al. // Endocrinology. — 1991. — Vol. 129, N 5. — P. 2521—2529.
16. Harbuz M., Lighfman S. // J. Endocrinol. — 1992. — Vol. 134, N 3. — P. 327—339.
17. Hillhouse E., Milton N. // Ibid. — 1989. — Vol. 12, N 3. — P. 719—723.
18. Kaplan L., Lopez Costa J. J., Carbone S. E. et al. // Placenta. — 1989. — Vol. 10, N 5. — P. 502—503.
19. Kataoka Y., Gutman Y., Guidotti A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81, N 10. — P. 3218—3222.
20. Kombian S., Zidichouski J., Rittman Q. // J. Neurophysiol. — 1996. — Vol. 76, N 2. — P. 1166—1179.
21. Matheson K. // Brain Res. Bull. — 1980. — Vol. 5. — Suppl. 2. — P. 447—452.
22. Oset-Gasque M., Castro E., Gonzalez M. // J. Neurosci. Res. — 1990. — Vol. 26, N 2. — P. 181—187.
23. Racagni G., Apud J., Cocchi D. et al. // Life Sci. — 1982. — Vol. 31, N 9. — P. 823—838.
24. Romero L., Sapolsky R. // J. Neuroendocrinol. — 1996. — Vol. 8, N 4. — P. 243—258.
25. Tilders F., Goey F., De Berkenbosch D., Dijkstra H. // Neuroendocrinol. Lett. — 1988. — Vol. 10, N 4. — P. 223.
26. Whitehouse B. // J. Endocrinol. — 1992. — Vol. 134, N 1. — P. 1—3.
27. Wojtak C., Landgraf R., Engelmann M. // Proceedings of the 24-th Gottingen Neurobiological Conference. — Gottingen. 1996. — Vol. 2. — P. 677.

Поступила 28.07.2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 615.272.03.616.379-008.64].015.44.076.9

А. В. Траилин, Ю. М. Колесник, М. А. Орловский

СОСТОЯНИЕ NPY-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА У НОРМАЛЬНЫХ И ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СИНТЕТИЧЕСКОГО НЕЙРОПЕПТИДА Y

Кафедра патофизиологии (зав. — проф. Ю. М. Колесник) Запорожского государственного медицинского университета

Целью исследования явились идентификация и изучение состояния NPY-синтезирующих клеток островков Лангерганса у крыс линии Вистар в норме, при стрептозотоциновом сахарном диабете различного срока, а также при хроническом введении синтетического NPY животным с диабетом. NPY- и инсулинсинтезирующие клетки в островках идентифицировали методом непрямой иммунофлюоресценции наборами фирмы "Peninsula Laboratories Inc." (США) и анализировали их состояние с помощью компьютерной системы анализа изображения VIDAS-386 ("Kontron Elektronik", Германия).

NPY-иммунореактивные клетки выявлялись в островках у нормальных животных и имели разнообразную форму и размеры. Развитие сахарного диабета к концу 3-й недели приводило к увеличению их количества по сравнению с контролем более чем в 2 раза, что указывало на активацию син-

The purpose of this study was identification and evaluation of NPY-synthesizing cells of Langerhans' islets in Wistar rats in health, streptozotocin diabetes of different duration, and during chronic treatment of diabetic animals by synthetic NPY.

NPY- and insulin-producing cells in the islets were identified by indirect immunofluorescence using Peninsula Laboratories Inc. kits (USA) and their status was analyzed by VIDAS-386 image processing (Kontron Elektronik, Germany).

NPY-immunoreactive cells of different shape and size were detected in the islets of normal animals. Three-week development of diabetes led to more than twofold increase in their count in comparison with the control, indicating activation of