

BLOKADA SINTEZE AZOT-MONOKSIDA STIMULIŠE AKTIVNOST KORTEKSA NADBUBREŽNE ŽLEZDE

Dragoslava Đikić¹, Mirela Budec¹, Sanja Vranješ Đurić², Vesna Koko¹, Sanja Vignjević¹, Olivera Mitrović¹

¹Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd

²Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Beograd

BLOCKADE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS STIMULATES THE ACTIVITY OF ADRENAL CORTEX

Dragoslava Djikić¹, Mirela Budec¹, Sanja Vranjes Djuric², Vesna Koko¹, Sanja Vignjevic¹, Olivera Mitrovic¹

¹Institute for Medical Research, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Institute for Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SAŽETAK

Cilj. Iako je poznato da azot-monoksid modulira aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine, funkcionalni značaj tog delovanja nije rasvetljen. Pored toga, dejstvo azot-monoksida na kortikalnu ekspresiju glukokortikoidnog receptora nije istraženo. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj endogenog azot-monoksida na strukturu i funkciju kore nadbubrežne žlezde pacova i adrenokortikalnu ekspresiju glukokortikoidnog receptora.

Metode. Odrasle ženke pacova Wistar soja u metestrusnoj fazi ciklusa tretirane su Nω-nitro-L-arginin metil esterom (L-NAME), inhibitorom sve tri izoforme azot-monoksid sintaze, u dozi 30 mg/kg, subkutano. Koncentracije adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikosterona u krvi određene su radioimunološkom metodom. Na parafinskim presecima nadbubrežne žlezde izvršena je stereološka i imunohistohemijska analiza korteksa.

Rezultati. Blokada sinteze azot-monoksida značajno povećava koncentracije ACTH i kortikosterona u krvi. Stereološka analiza je pokazala da tretman sa L-NAME značajno smanjuje numeričku gustinu ćelija u svim kortikalnim zonama. U skladu sa smanjenom numeričkom gustinom, L-NAME značajno povećava volumen ćelija u sve tri zone korteksa. Inhibicija sinteze azot-monoksida smanjuje ekspresiju glukokortikoidnog receptora u zoni fascikulati i zoni retikularis.

Zaključak. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da endogeni azot-monoksid inhibira aktivnost kore nadbubrežne žlezde i da modulira ekspresiju glukokortikoidnog receptora.

Ključne reči: azot-monoksid; NG-nitroarginin metil ester; kora nadbubrežna; receptori, glukokortikoidni; pacovi.

UVOD

Azot-monoksid (NO), signalni molekul značajan za održavanje homeostaze organizma (1), sintetiše se oksidacijom L-arginina koju katalizuju tri izoforme enzima NO sintaze (NOS): dve konstitutivne – neuronalna (nNOS) i endotelna (eNOS), i jedna inducibilna (iNOS) koja se eksprimira u imunskim ćelijama kao odgovor na dejstvo lipopolisaharida i citokina. Prema novijim saznanjima, NO može nastati i konverzijom nitrita i nitrata

ABSTRACT

Objective. Although it is known that nitric oxide modulates the activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, its functional significance has not been elucidated. Additionally, there is no information on the effect of nitric oxide on cortical expression of glucocorticoid receptor. The purpose of this study was to investigate the influence of endogenous nitric oxide on structure and function of rat adrenal cortex and adrenocortical expression of glucocorticoid receptor.

Methods. Adult female Wistar rats showing diestrus day 1 were treated with Nω-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), an inhibitor of all three isoforms of nitric oxide synthase, at a dose of 30 mg/kg, subcutaneously. The concentrations of adrenocorticotrop hormone (ACTH) and corticosterone were determined by radioimmunoassay. Stereological and immunohistochemical analyses were performed on paraffin sections.

Results. Blockade of nitric oxide production significantly increased blood levels of ACTH and corticosterone. Stereological analysis showed that treatment with L-NAME significantly decreased numerical density of the cells in all cortical zones. Consistent with the decreased numerical density, L-NAME significantly increased the volume of cells in cortical zones. Inhibition of nitric oxide synthesis decreased expression of glucocorticoid receptor in zona fasciculata and zona reticularis.

Conclusion. Obtained results indicate that endogenous nitric oxide inhibits activity of adrenal cortex and modulates expression of glucocorticoid receptor.

Key words: nitric oxide; NG-nitroarginine methyl ester; adrenal cortex; receptors, glucocorticoid; rats.

(2) što predstavlja njegov alternativni izvor u uslovima hipoksije. Azot-monoksid učestvuje u regulaciji različitih bioloških procesa u organizmu. Mehanizmi delovanja NO obuhvataju: aktivaciju solubilne gvanilat ciklaze i stvaranje cikličnog guanozin-monofosfata, vezivanje sa hem grupama u drugim enzimima, formiranje peroksinitritnog anjona u reakciji sa superoksidnim anjonom, i nitrozilaciju proteina, lipida i nukleinskih kiselina (3, 4).

Nadbubrežna žlezda kao deo hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (HPA) osovine i simpatoadrenalnog sistema reguliše odgovor organizma na različite stresore. Nervni impulsi, hormonsko i citokinsko delovanje integrišu se na nivou hipotalamusa odakle se putem kortikotropin oslobađajućeg hormona i arginin-vasopresina utiče na aktivnost adenohipofize. Adrenokortikotropni hormon (ACTH) reguliše veličinu, strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde. Primarno mesto delovanja ovog hormona su steroidogene ćelije zone fascikulate (ZF), koje brzo reaguju na stimulaciju, i zone retikularis (ZR), koje održavaju, kako bazalnu tako i sekreciju glukokortikoida izazvanu prolongiranom stimulacijom sa ACTH (5). U nedostatku ACTH inhibirana je steroidogeneza i nastaje atrofija korteksa (6).

Glukokortikoidni hormoni deluju na skoro sve ćelije u organizmu preko: mineralokortikoidnih (tip 1) receptora visokog afiniteta i široko rasprostranjenih glukokortikoidnih (tip 2) receptora (GR) slabijeg afiniteta, koji selektivno vezuju glukokortikoidne hormone (7). Oba tipa receptora funkcionišu kao transkripcioni faktori, zavisni od liganda. U kori nadbubrežne žlezde čoveka (8) i fetusa ovce (9) dokazana je ekspresija glukokortikoidnog receptora što ukazuje na to da bi mogao imati ulogu u regulaciji produkcije kortikalnih hormona.

Poznato je da NO na različitim nivoima modulira aktivnost HPA osovine u stresu (10). Prisustvo eNOS dokazano je u nadbubrežnim žlezdama mnogih eksperimentalnih životinja: u kapsuli i ćelijama zone glomeruloze (ZG) i ZF pacova (11) ZG, Z. intermedii, ZF i meduli ovaca, kao i ZG i ZR majmuna (12). Iako je opšteprihvaćeno da je NO modulator steroidogeneze (13), dosadašnja istraživanja dala su oprečne rezultate.

Imajući na umu da uloga NO u regulaciji aktivnosti kore nadbubrežne žlezde nije u potpunosti rasvetljena, analizirali smo ZG, ZF i ZR stereološkom metodom i odredili koncentracije kortikosterona i ACTH nakon inhibicije sinteze NO N ω -nitro-L-arginin-metil estrom (L-NAME), kompetitivnim inhibitorom sve tri forme NOS. Kako nema podataka o uticaju NO na glukokortikoidni receptor u nadbubrežnoj žlezdi, pokazali smo primenom imunohistohemije da L-NAME smanjuje ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ZF i ZR.

MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni dizajn

U eksperimentu su korišćene odrasle ženke pacova *Wistar* soja, starosti 2–3 meseca, telesne mase 200–250 g, čuvane pod uslovima konstantne temperature (20–22°C) i vlažnosti sa smenom svetlost/tama na 12 sati. Hranu i vodu unosile su *ad libitum*. Faze estrusnog ciklusa određivane su svakog dana na osnovu morfologije i međusobnog odnosa broja epitelnih ćelija i leukocita u vaginalnom razmazu. Za eksperimente su izdvajane samo

ženke u jednoj fazi estrusnog ciklusa – metestrusa. Pacovi su tretirani sa L-NAME (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) rastvorenim u fiziološkom rastvoru, 30 mg/kg, subkutano (sc). Kao kontrolna grupa služile su netretirane životinje. Tri sata nakon tretmana pacovi su žrtvovani dekapitacijom i od svake životinje uzeti su uzorci krvi za određivanje ACTH i kortikosterona, kao i leva nadbubrežna žlezda za histološku, stereološku i imunohistohemijsku analizu. Kako bismo izbegli uticaj cirkadijalnog ritma (14) na aktivnost HPA osovine, eksperimente smo radili između 8.00 i 12.00 časova.

Eksperimenti su izvedeni u skladu sa lokalnim Pravilnikom Instituta za medicinska istraživanja o korišćenju i čuvanju eksperimentalnih životinja i principima Kanadskog saveta za brigu o životinjama (Canadian Council on Animal Care).

Određivanje nivoa hormona

Krv je od svake životinje uzimana u dve epruvete pri čemu se u onoj za plazmu nalazila EDTA. Uzorci krvi centrifugirani su na 2.000 obrtaja 10 minuta (4°C). Alikvoti seruma i plazme čuvani su na -20°C do analize.

Koncentracije ACTH u plazmi i kortikosterona u serumu određene su radioimunološkom metodom pri čemu su korišćeni odgovarajući komercijalni kitovi: za ACTH *double antibody radioimmunoassay* ¹²⁵I hACTH (MP Biomedicals LLC, Orangeburg, NY, USA), a za kortikosteron *Amersham Biotrak rat corticosterone* [¹²⁵I] *assay system* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) sa magnetnom separacijom.

Određivanje numeričke gustine i volumena ćelija

Nadbubrežne žlezde izmerene su na analitičkoj vagi, fiksirane u 10% neutralnom formalinu i podvrgnute klasičnoj proceduri izrade histoloških preparata. Parafinski preseći, debljine 6 μ m, obojeni su trihromnom Azan metodom.

Na presećima nadbubrežne žlezde najpre je urađena kvalitativna histološka analiza, a zatim primenom višenamenskog testnog sistema M-42, stereološka analiza na mikroskopu pod imerzijom (uvećanje objektiva 100 X). Na osnovu rezultata stereološke analize, izračunate su, prema odgovarajućim formulama, numerička gustina (Nvf) ćelija i jedara i prosečan volumen ćelija (Vf) ZG, ZF i ZR.

Imunohistohemijska analiza glukokortikoidnog receptora

Analiza ekspresije glukokortikoidnog receptora u ćelijama kore nadbubrežne žlezde urađena je indirektnom imunohistohemijskom metodom. Da bi se demaskirali antigeni, posle deparafinizacije, tkivni preseći su u citratnom puferu (10 mmol/l), pH 6, dva minuta izlagani

visokoj temperaturi pod pritiskom. Endogena peroksidaza je blokirana pomoću vodenog rastvora 3% H₂O₂ (NRK inženjering, Beograd, Srbija). Zatim su preseki inkubirani sa primarnim antitelom GR(M-20): sc-1004, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA (1 : 200) u trajanju od tri sata. Nakon toga je izvršena inkubacija sa biotiniziranim imunoglobulinima. U sledećoj etapi preseki su tretirani streptavidinskim konjugatom na peroksidazu rena, 30 minuta. Kompleks antigen–antitelo vizuelizovan je primenom DAB+ supstrat/hromogen sistema (DAKO liquid DAB+ substrate/chromogen system). Čelijska jedra su kontrastirana Mayer-ovim hematoksilom.

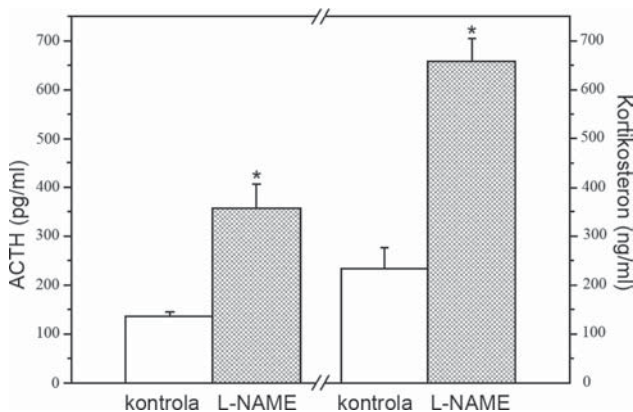
Imunoreaktivne ćelije su analizirane na istraživačkom mikroskopu Olympus AX70 uz primenu softvera – analySIS Pro 3.1. Semikvantitativna procena ekspresije GR izvršena je na osnovu intenziteta bojenja: + slaba, ++ umerena i +++ intenzivna. U svakoj zoni su analizirana po tri reprezentativna polja i rezultati su prikazani kao skor intenziteta i broja imunoreaktivnih ćelija, odnosno nukleusa.

Statistička analiza

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška (SEM). Razlike među grupama određene su primenom t-testa.

REZULTATI

Dejstvo L-NAME na oslobađanje ACTH prikazano je na slici 1 (leva strana). Zapaža se da blokada sinteze NO značajno povećava koncentraciju ACTH (p < 0,01) u poređenju sa netretiranim životinjama.

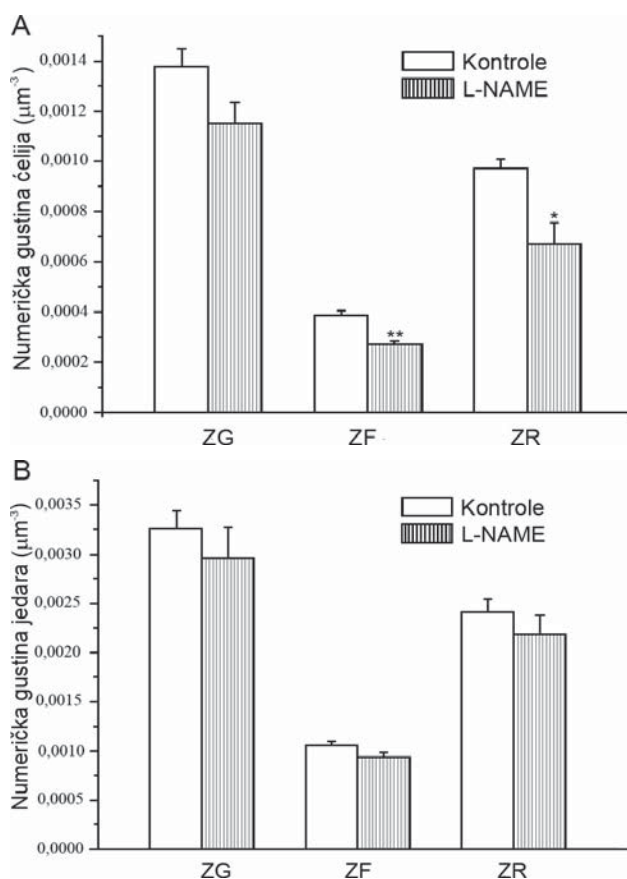


Slika 1. Koncentracija ACTH i kortikosterona u krvi pacova kontrolne i eksperimentalne grupe (* p < 0,05 u poređenju sa kontrolama).

Kako bismo procenili funkciju korteksa nadbubrežne žlezde, odredili smo nivo kortikosterona u serumu. Tretman sa L-NAME značajno povećava koncentraciju kortikosterona (p < 0,01) u odnosu na kontrolnu grupu (slika 1, desna strana).

Kvalitativna histološka analiza preseka nadbubrežne žlezde, obojenih Azan metodom, pokazala je da je nakon inhibicije sinteze NO arhitektura organa očuvana. Prosečne vrednosti numeričkih gustina adrenokortikalnih ćelija i njihovih jedara prikazane su na slici 2. Uočava se da L-NAME značajno smanjuje numeričku gustinu ćelija u svim zonama korteksa (p < 0,01 ZF; p < 0,05 ZR). Isti trend zapažen je i kod numeričke gustine jedara, ali razlika ne dostiže statističku značajnost.

Primenom stereološke metode, odredili smo volumen adrenokortikalnih ćelija u ZG, ZF i ZR posle tretmana sa L-NAME. Rezultati, predstavljeni u tabeli 1, pokazuju da



Slika 2. Numerička gustina ćelija (A) i jedara (B) korteksa nadbubrežne žlezde kontrolne i tretirane grupe pacova (* p < 0,05 u poređenju sa kontrolama, ** p < 0,01 u poređenju sa kontrolama).

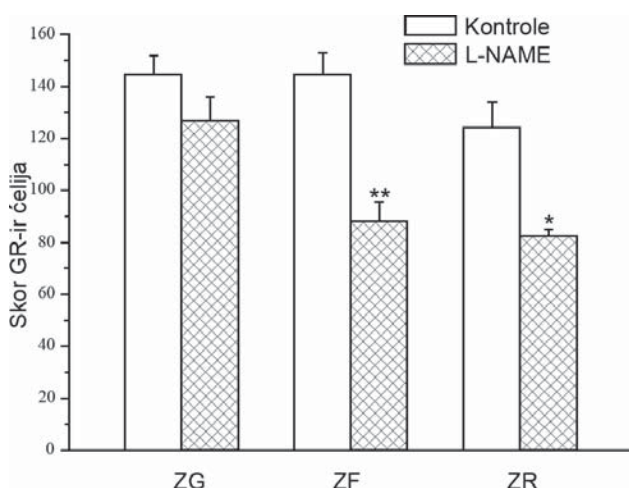
Tabela 1. Volumeni adrenokortikalnih ćelija nadbubrežne žlezde (µm³) kontrolne grupe pacova i grupe tretirane sa L-NAME.

Grupa	Zona glomerulosa	Zona fascikulata	Zona retikularis
Kontrolne	629,36 ± 40,42	2375,89 ± 144,35	787,74 ± 53,36
L-NAME (30 mg/kg)	865,68 ± 60,42*	3510,70 ± 173,29**	1090,48 ± 96,05*

* < 0,05; ** p < 0,01; brojevi predstavljaju srednju vrednosti i standardnu devijaciju

L-NAME povećava volumen ćelija u sve tri zone u poređenju s netretiranim životinjama ($p < 0,05$ ZG, ZR; $p < 0,01$ ZF).

Imunohistohemijskom metodom detektovali smo ekspresiju glukokortikoidnog receptora u kori nadbubrežne žlezde tretiranih i kontrolnih životinja. U svim zonama kore uočava se intenzivna nuklearna imunoreaktivnost. Semikvantitativna analiza je pokazala da blokada sinteze NO značajno smanjuje ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ZF i ZR u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$ ZF; $p < 0,05$ ZR). U ZG ekspresija glukokortikoidnog receptora nije statistički značajno različita među grupama (slika 3).



Slika 3. Ekspresija GR u korteksu nadbubrežne žlezde pacova kod kontrola i nakon tretmana sa L-NAME (* $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolama, ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolama).

DISKUSIJA

Naši rezultati, dobijeni primenom L-NAME, pokazuju da endogeni NO inhibiše aktivnost kore nadbubrežne žlezde kao i da povećava ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ZF i ZR. Prisustvo NOS dokazano je na svim nivoima HPA osovine: u paraventrikularnom jedru hipotalamusa, hipofizi i nadbubrežnoj žlezdi (15). U kori nadbubrežne žlezde pacova, ćelije ZF ekspimiraju nNOS i eNOS i lokalno sintetisan NO modulise sintezu steroidnih hormona (11). U eksperimentima smo koristili odrasle ženke pacova u samo jednoj, metestrusnoj fazi ciklusa, jer ekspresija nNOS (16) i nivo kortikosterona (17) variraju tokom estrusnog ciklusa.

Morfometrijska analiza pokazala je da L-NAME značajno povećava volumen i smanjuje numeričku gustinu ćelija ZF i ZR što ukazuje na povećanu funkciju. Aktivacija kortikalnih ćelija dokazana je porastom nivoa kortikosterona u cirkulaciji nakon blokade sinteze NO. Naši rezultati odgovaraju podacima iz literature (18, 19), prema kojima endogeni NO inhibiše sintezu steroidnih hormona. Ovaj efekat potvrđen je i u *in vitro* uslovima gde

NO inhibiše produkciju aldosterona (20) i kortikosterona (21). Povećana koncentracija ACTH u grupi tretiranoj sa L-NAME ukazuje na to da je porast u nivou kortikosterona posledica aktivacije HPA osovine. U kulturi adrenokortikalnih ćelija fetusa koji su se razvijali u uslovima hipoksije L-NAME povećava produkciju kortikosterona stimulisanu sa ACTH (22). Suprotno našim rezultatima, pokazano je i da L-NAME ne utiče na bazalne koncentracije ACTH i kortikosterona u pacova (23). Navedene razlike bi se mogle objasniti primenom različite doze L-NAME (30 mg/kg vs 5–10 mg/kg), načina davanja (subkutano vs intraperitonealno) i vremena proteklog od tretmana do žrtvovanja (180 min vs 75 min).

Glukokortikoidni receptor se u fiziološkim uslovima eksprimira u kori nadbubrežne žlezde čoveka (8). Ekspresija je povećana u adenomima koji sekretuju kortizol (24) i adenokarcinomima (25), pa se pretpostavlja da bi glukokortikoidni receptor mogao imati ulogu u patogenezi kortikalnih tumora.

U našem eksperimentu L-NAME smanjuje ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ZF i ZR što ukazuje na to da endogeni NO učestvuje u njegovoj regulaciji. Kako se NO sintetise u ćelijama ZF (11), moguće je da deluje kao autokrino/parakrini modulator. Pored toga, može se pretpostaviti da je smanjena ekspresija glukokortikoidnog receptora u grupi tretiranoj sa L-NAME posledica nishodne regulacije povećanim nivoom kortikosterona, jer je opisano da deksametazon smanjuje koncentraciju mRNA za glukokortikoidni receptor u nadbubrežnoj žlezdi (26). Naši rezultati su u skladu sa povećanjem ekspresije glukokortikoidnog receptora u plućima, jetri i bubregu svinje posle inhalacije NO u toku sepse (27).

Povećan volumen i smanjena numerička gustina ćelija ZF i ZR, povećana koncentracija kortikosterona i smanjena ekspresija glukokortikoidnog receptora u grupi tretiranoj sa L-NAME ukazuju na to da endogeni NO inhibiše aktivnost kore nadbubrežne žlezde i povećava ekspresiju glukokortikoidnog receptora u ZF i ZR. Kako bi se ispitali mehanizmi dejstva NO na posmatrane parametre potrebna su dalja istraživanja.

SPISAK SKRAĆENICA

- ACTH – adrenokortikotropni hormon
- EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina
- GR – glukokortikoidni receptor
- HPA - osovina - hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osovina
- L-NAME – N ω -nitro-L-arginin metil ester
- NO – azot-monoksid
- NOS – NO sintaza
- ZF – zona facikulata
- ZG – zona glomeruloza
- ZR – zona retikularis

LITERATURA

1. Stern JE. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration. *Prog Biophys Mol Biol* 2004; 84: 197–215.
2. Lundberg JO, Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 39–45.
3. Thippeswamy T, McKay JS, Quinn JP, Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced janus-is this good or bad. *Histol Histopathol* 2006; 21: 445–58.
4. Kots AY, Bian K, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling pathway as a focus for drug development. *Curr Med Chem* 2011; 18: 3299–305.
5. Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Gardner DG, Shoback D, eds. *Greenspan's basic and clinical endocrinology*. 8th ed. New York: Mc Graw Hill Companies, 2007: 346–95.
6. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology* 2004; 145: 4320–29.
7. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 258–68.
8. Paust HJ, Loeper S, Else T, et al. Expression of the glucocorticoid receptor in the human adrenal cortex. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 6–10.
9. Root B, Abrassart J, Myers DA, Monau T, Ducsay CA. Expression and distribution of glucocorticoid receptors in the ovine fetal adrenal cortex: effect of long-term hypoxia. *Reprod Sci* 2008; 15: 517–28.
10. Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem* 2010; 113: 563–75.
11. Cymeryng CB, Lotito SP, Colonna C, et al. Expression of nitric oxide synthases in rat adrenal zona fasciculata cells. *Endocrinology* 2002; 143: 1235–42.
12. Peterson JK, Moran F, Conley AJ, Bird IM. Zonal expression of endothelial nitric oxide synthase in sheep and rhesus adrenal cortex. *Endocrinology* 2001; 142: 5351–63.
13. Ducsay CA, Myers DA. eNOS activation and NO function: Differential control of steroidogenesis by nitric oxide and its adaptation with hypoxia. *J Endocrinol* 2011; 210: 259–69.
14. Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349: 20–9.
15. López-Figueroa MO, Day HE, Akil H, Watson SJ. Nitric oxide in the stress axis. *Histol Histopathol* 1998; 13: 1243–52.
16. Sica M, Martini M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *BMC Neurosci* 2009; 10: 78.
17. Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 1997; 138: 3842–8.
18. Adams ML, Nock B, Truong R, Cicero TJ. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of NG-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sci* 1992; 50: PL35–40.
19. Giordano M, Vermeulen M, Trevani AS, Dran G, Andonegui G, Geffner JR. Nitric oxide synthase inhibitors enhance plasma levels of corticosterone and ACTH. *Acta Physiol Scand* 1996; 157: 259–64.
20. Hanke CJ, Drewett JG, Myers CR, Campbell WB. Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect. *Endocrinology* 1998; 139: 4053–60.
21. Cymeryng CB, Dada LA, Podestá EJ. Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. *J Endocrinol* 1998; 158: 197–203.
22. Monau TS, Vargas VE, Zhang L, Myers DA, Ducsay CA. Nitric Oxide inhibits ACTH-induced cortisol production in near-term, long-term hypoxic ovine fetal adrenocortical cells. *Reproductive Sciences* 2010; 17: 955–62.
23. Bugajski J, Borycz J, Gadek-Michalska A, Głód R. Effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase inhibitor, on corticotropin-releasing hormone-elicited ACTH and corticosterone secretion. *J Physiol Pharmacol* 1998; 49: 607–16.
24. Boyle B, Butz H, Liko I, et al. Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids* 2010; 75: 695–700.
25. Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, et al. The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4591–99.
26. Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffman AR, Perlman AJ. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987; 262: 10441–4.
27. Da J, Chen L, Hedenstierna G. Nitric oxide up-regulates the glucocorticoid receptor and blunts the inflammatory reaction in porcine endotoxin sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 26–32.