

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В.ПАЛЛАДІНА**

**На правах рукопису**

**ОРЛОВА Олена Анатоліївна**

**ПОРІВНЯЛЬНІ ДИНАМІЧНІ АСПЕКТИ  
БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГОРМОНІВ  
ЗА ДАНИМИ ЯМР-РЕЛАКСОМЕТРІЇ IN VITRO**

**03.00.04 - Біохімія**

**А в т о р е ф е р а т**  
**дисертації на здобуття наукового ступеня**  
**кандидата біологічних наук**

**Київ-1996**



00739849 (/)

AB. 35.892

Трест виконана в науково-Дослідному центрі Луганського державного медичного університету.

**Науковий керівник :** доктор медичних наук ,  
професор  
**КОМАРЄВЦЕВА Ірина Олександрівна**

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук ,  
професор  
**ВОЙЦЬКИЙ Володимир Михайлович**

доктор медичних наук ,  
старший науковий співробітник  
**ЛУЧИЦЬКИЙ Євгеній Васильович**

**Провідна організація :** Український національний медичний  
університет ім. акад. О.О.Богомольця,  
м.Київ

Захист відбудеться " 18 " листопада 1996р.на  
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 при Інституті  
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (252 601 м.Київ-30, вул.  
Леонтовича,9 )  
о 14/00

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту  
біохімії ім. О.В.Палладіна.  
Автореферат розісланий " 16 " листопада 1996р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради

к.б.н. О.В.Кірсенко

AB - 35.892

### Актуальність проблеми.

Під час еволюції сформувалися дві основні системи, які виконують функцію міжклітинної комунікації: нервова, яка розглядається, як система проведення сигналів, та гормональна, яка використовує у якості мобільних посередників гормони, котрі секретуються специфічними клітинами і потім транспортуються, впливаючи на прилеглі чи віддалені тканини (Breuer M.D., 1994).

Одним з актуальних та інтригуючих питань сучасної біохімії є питання про те, як гормональний сигнал, адресований клітинній мембрані, трансформується у ланцюг подій, що несуть цю інформацію до клітини.

Принцип генералізованої реакції мембрани на гормон і є основою специфічності гормональної дії з тієї думки, що поодинокі молекули гормону, завдяки послідовному посиленню цього сигналу та розповсюдженню його післядії, викликають зміни у ряді ефекторних систем клітини. Ймовірно, в основі впливу багатьох гормонів лежать генералізовані структурні переходи, що змінюють білкові, ліпідні, вуглеводні та інші компоненти плазматичної мембрани. В цьому плані особливий інтерес викликає середовище протікання всіх метаболічних процесів організму - вода та водні компартменти організму.

Вода гідратації впливає на структурне формування мембран і являється безпосереднім середовищем всіх мембранних процесів. Припускають, що оборотна зміна структури води в мембранах супроводжується конформаційними змінами білка та розташуванням полярних ліпідів (Gattido L., 1994). Дія гормонів, певно, здійснюється шляхом впливу на структуру зв'язаної з мембраною води, що й визначає їх генералізований системний ефект на кліти-

ну-мішень.

Зміну фізико-хімічних властивостей тканинної води відображує ядерно-магнітно-резонансна релаксація. Внаслідок протонного обміну між гідрованою та вільною фракціями тканинної води змінюються часи релаксації. Їх величина залежить від загальної кількості води в тканинах та здібності зв'язувати воду в гідрований шар (T1), а також від концентрації місць зв'язування кристалічної води й товщини мультислою гідрованої води (Brooks D., 1994).

Таким чином, вивчення гідроосмотичних ефектів гормонів методом ЯМР-релаксації протонів тканинної води відкриває шлях до розуміння біохімічних механізмів їх дії на структурно-конформаційному рівні.

Робота виконана в межах конкурсної держбюджетної теми МЗ України К 1/7.21.12.94 "Ендогенні опіоїди та гуморальне зveno функціональної адаптації нирок в регуляції артеріального тиску та водно-електролітного балансу при есенціальній гіпертензії й ниркової патології", а також планової держбюджетної тематики НДЦ ЛДМУ "Вплив екологічно небезпечних факторів на організм в умовах промислового регіону та розробка методів корекції метаболізму й інтенсивної терапії" (регістраційний номер 01.0.10.033409).

#### Мета роботи.

Вивчити вплив пептидних та стероїдних гормонів на ЯМР-релаксацію протонів тканинної води, фракційний склад водних компартментів, їх внутрішньо- та позаклітинне розміщення.

#### Відповідно до поставленої мети завданням роботи було:

1. Провести порівняльний аналіз гідроосмотичної активності пептидних та стероїдних гормонів методом ЯМР-релаксації

протонів тканинної води.

2. На основі біекспоненціальних характеристик ЯМР-показників тканинної води вивчити її фракційний склад, внутрішньо- та позаклітинний розподіл у тканинах-мішенях (мозку, нирках) під впливом пептидних та стероїдних гормонів.

3. Враховуючи відомі механізми дії гормонів, що досліджувалися, визначити роль тканинної води в гормонокомпетентності клітини як регуляторної та ефекторної системи.

4. Визначити найбільш ЯМР-релаксаційно активні гормони, які можуть бути використані для практичного вживання, як контрастні агенти в ЯМР-томографії.

#### Наукова новизна роботи.

Вперше проведено дослідження впливу біологічно-активних речовин як центрального походження (АКТГ, пролактин, вазопресин), так і проміжних рівнів (паратгормон, кальцитонін, альдостерон, прогестерон, тестостерон) на транспорт тканинної води нирок та мозку щурів методом ЯМР-релаксометрії з урахуванням маси відповідних органів. Визначено характер гідроосмотичного ефекту гормонів на тканинному рівні (нирки, мозок) відповідно до природи (білково-пептидної та стероїдної).

Вперше встановлено співвідношення внутрішньо- та міжклітинної води мозку, нирок як в умовах фізіологічного спокою, так і під впливом біологічно-активних речовин. Виміряні T1- та T2-показники релаксації протонів тканинної води мозку і нирок щурів після інкубації з гормонами у різних концентраціях, які відобразили молекулярно-структурну різноманітність фракційного складу тканинної ріднини. Виявлено значення концентрацій гормонів, при яких спостерігався максимальний гідроосмотич-

ний ефект.

Вперше сформульовано положення про ефекторну та регуляторну роль тканинної води в реалізації гормонального стимулу, який забезпечує генералізацію гормоноіндукованих процесів у клітинній мембрані, що дозволяє пояснити механізм розпізнавання, посилення, реалізації та потенціювання дії гормонів, який фактично полягає у створенні та порушенні водної структури. Отримані різноспрямовані результати гідроосмотичної активності пептидних та стероїдних гормонів відображують їх різний вплив на фізико-хімічні властивості тканинної води.

#### Практичне значення роботи.

Розроблений метод вивчення гідроосмотичних ефектів біологічно-активних речовин у нирках та мозку за магнітно-релаксаційними параметрами з урахуванням маси тканини, який поєднує в собі точність і високу ефективність з простотою відтворення, дозволяє проводити дослідження швидко та з невеликою кількістю тканини і може бути застосований для вивчення водного транспорту не тільки у нирках та мозку, а й в інших тканинах.

Виявлений гідроосмотичний ефект ряду гормонів дозволяє рекомендувати їх для використання, як природні контрастні агенти в ЯМР-діагностиці. Результати про фракційний склад тканинної води, її внутрішньо- та міжклітинне співвідношення в умовах дії біологічно активних речовин на ізольовані біопрепарати є важливими для пояснення механізмів ЯМР-контрастів та їх залежності від конкретної патології.

Розроблений методичний підхід вимірювання часу протонної релаксації є перспективним для вивчення структурного стану води в тканинах *in vivo* під час гормональної патології.

Отримані дані можуть бути використані в ЯМР-центрах України, зокрема у м.Луганську.

#### Основні положення, які виносяться на захист:

1. Вивчені пептидні та стероїдні гормони мають гідроосмотичну та ЯМР-релаксаційну активність, пов'язану зі специфічною фракційною гетерогенністю тканинної води в тканинах-мішенях.

2. Пептидні гормони (вазопресин, опіати, пролактин, АКТГ, ПТГ, кальцитонін) дозозалежно викликають дегідратацію тканини, тоді як стероїдні (у фізіологічних дозах) - гідратацію, що обумовлено їх амфифільною селективністю і різноманітним ступенем поляризації води, які пов'язані з їх хімічною структурою та механізмом пострецепторного впливу.

3. Здатність гормонів як зменшувати, так і підвищувати час релаксації, змінювати гідратацію тканин, впливати на стан не тільки внутрішньоклітинної, але й міжклітинної води, розподіляти окремі фракції тканинної води між клітиною і позаклітинним простором, а головне - їх тканинна специфічність і селективність дозволяють розглядати гідроосмотично активні гормони як самостійні контрастні агенти для ЯМР-томографії або як носії для традиційних парамагнетиків.

#### Апробація роботи.

Окремі фрагменти дисертації повідомлені на I з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), науково-практичній конференції "Екологія Донбасу" (м.Луганськ, 1993).

#### Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена на 180 стор. машинопису, складається з вступу, аналітичного огляду літератури, розділу "Матеріали і методи досліджень", трьох розділів власних досліджень, заключного обговорення експериментальних даних, вис-

новків, покажчика літератури, який включає 42 вітчизняних та 123 іноземних джерел.

#### Конкретний особистий вклад автора.

Експериментальний матеріал був цілком виконаний дисертантом О.А. Орловою самостійно. Вона вперше встановила дозозалежний характер гідроосмотичної дії гормонів різної природи на тканинному рівні. Розглянула стан про ефекторну та регуляторну роль тканинної води в реалізації гормонального стимулу, який забезпечує генералізацію гормоноіндукованих процесів у клітинній мембрані, що дозволяє пояснити механізм дії гормонів з точки зору створення та порушення водної структури.

#### Впровадження в практику одержаних результатів.

Одержані в експерименті дані про спрямованість гідроосмотичної активності біологічно активних пептидів та стероїдів на тканини нирок та мозку було впроваджено в лекційному матеріалі на тему "Гормональна регуляція водно-електролітного балансу організму" на кафедрі медбіохімії Луганського держ.мед.університету. Магнітнорелаксаційні характеристики ниркової тканини та мозку в нормі та під впливом біологічно-активних речовин було розглянуто фахівцями науково-дослідної лабораторії ЯМР - спектроскопії НІЦМД "Резонанс" м.Луганська для подальшого їх вивчення при розробці нових природних контрастних агентів.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 10 робіт.

#### Матеріали і методи дослідження.

Дослідження проведено на 600 білих щурах-самках лінії Вістар у віці від 8 до 10 тижнів. Експериментальна частина роботи виконувалась згідно з Правилами проведення робіт з експери-

ментальними тваринами, які затверджені Наказом МОЗ СРСР N755 від 12.08.1977 р.

Тварин забивали декапітацією й виймали нирки та мозок. Для вирішення поставленого завдання - вивчення характеру дії біологічно-активних пептидів, стероїдів, ендогенних та синтетичних опіоїдів на транспорт води нирок та мозку - використовувався "Спосіб визначення водного балансу організму *in vitro* на прикладі тканини нирок реєстрацією T1- і T2-показників часу релаксації протонів тканинної води методом ЯМР-релаксометрії" (І.О.Комарєвцева, 1989). З цією метою в інкубаційне середовище додавали аргінін-вазопресин (АВП) у концентраціях 5 пг/мл, 20 пг/мл, 80 пг/мл (Швейцарія); бета - ендорфін - 0,19 пмоль/л, 1,9 пмоль/л, 19 пмоль/л; синтетичних опіатів: лей-енкефалин - даларгін -  $5 \times 10^{-10}$  г/л,  $5 \times 10^{-8}$  г/л,  $5 \times 10^{-6}$  г/л; тирозин-феніл-аланін -  $5 \times 10^{-10}$  г/л,  $5 \times 10^{-8}$  г/л,  $5 \times 10^{-6}$  г/л; тирозин-аргінін -  $5 \times 10^{-10}$  г/л,  $5 \times 10^{-8}$  г/л,  $5 \times 10^{-6}$  г/л (США); пролактин - 20 мкМО/мл, 200 мкМО/мл, 2000 мкМО/мл; ПТГ - 5 пг/мл, 45 пг/мл, 450 пг/мл; кальцитонін - 20 пг/мл, 150 пг/мл, 500 пг/мл; АКТГ - 5 пг/мл, 25 пг/мл, 175 пг/мл (Франція); альдостерон - 10 пг/мл, 100 пг/мл, 500 пг/мл (Франція); прогестерон - 2 пмоль/л, 10 пмоль/л, 50 пмоль/л; тестостерон - 1 нмоль/л, 10 нмоль/л (Беларусь).

Інкубацію тканин проведено на водяній бані "Нааке" (Німеччина) при 37 С на протязі 30 хвилин.

До і після інкубації ниркову та мозкову тканини зважували за допомогою електронної ваги "Sartorius" (Німеччина).

Концентрацію іонів натрію й калію в інкубаційному середовищі вимірювали на біологічному алкалі-мікроаналізаторі (Угорщина).

T1- і T2 - показники часової релаксації протонів тканинної води вимірювали на приладі для ЯМР-релаксометрії "Minispec PC-120" фірми "Bruker" (Німеччина). Подовжня релаксація (T1) визначалася за методом "inversion - recovery" з використанням  $180^\circ$ -T- $90^\circ$ - імпульсної послідовності, а поперечна (T2) - за методом CPMG (Карра-Парселла-Мельбума-Гилла). Час повторення радіочастотного імпульсу був однаковим в обох випадках (3,0 сек). При наявності двокомпонентних кривих T1- і T2-параметри розкладалися на біекспоненти і по показниках Ta і Tb розраховували Pa та Pb, які характеризують розподіл між внутрішньо- (Pa) та позаклітинною (Pb) фракціями тканинної води. Експериментальні дані оброблялися автоматично персональним комп'ютером "Minispec" за допомогою серійного інтерфейса RS 232C за програмним пакетом фірми "Bruker" "DT1, DT2" "Experiment Supervisor".

Одержані результати опрацьовані статистично за допомогою t-критерію Стьюдента (Ю.Ф.Кабатов, М.Б.Славін, 1976) і оцінювались вірогідними при  $p < 0,05$ .

#### Результати та їх обговорення.

Накопичені за останній час факти дали поштовх до розвитку уявлення про те, що гормональна молекула не являє собою інформаційне послання, в якому записані усі данні, а, скоріше, має значення символу чи лексичної одиниці, яка виступає як тригер, котрий запускає специфічну для клітини інформацію, закодовану у рецепторному білку (Yates F.E., 1982, Csaba G., 1986).

Існуюче припущення про зміну просторової структури білків, які приймають участь у механізмах дії гормонів, базується на структурно-функціональній природі будь-якого білка, в амінокислотній послідовності якого закладена інформація про

придбання ним вторинної та третинної структури. До сих пір немає точних даних про які-небудь модифікації третинної та четвертинної структур будь-якого білка, який приймає участь в механізмі дії гормону (Дж.Теппермен та співавт.,1989). Однак, говорити про модифікуючий вплив гормонів на фізико-хімічний стан мембран неможливо без врахування їх амфіфільності та структуруючої ролі води в термодинамічній стабільності білою клітинної мембрани. Вода гідратації виконує структуруючу функцію у формуванні мембран та впливає майже на всі мембранні процеси.

Характер взаємодії води з поверхнями клітинних мембран відображують ЯМР-релаксаційні показники протонів тканинної води. Якщо в наслідок дії гормонів відбуваються конформаційні зміни у рецепторних та інших білках, то ЯМР-релаксація - специфічний універсальний регістратор впливу гормонів на тканину. Це одна сторона методичного підходу нашого дослідження.

З іншого боку, вибір у нашій роботі досліджуваних гормонів різноманітних за хімічною будовою, за механізмом трансмембранної дії, за видоспецифічністю до них рецепторів, за тканинами-мішенями та за фізіологічною активністю дозволив виявити ефекторну та регуляторну роль тканинної води у реалізації гормонального стимулу.

Досліджені нами гормони у більшому чи меншому ступені можуть впливати на водно-електролітний баланс *in vivo* чи *in vitro*, деякі безпосередньо, інші пермисивно. А гідроосмотична та іонорегуляторна активність частини з них до сих пір підлягає сумніву (Galcheva-Gargova Z., 1994).

Якщо розбирати здобуті нами результати ЯМР-показників

тканинної води та окремих її фракцій з фізіологічної точки зору, то досліджені нами пептидні та стероїдні гормони мають гідроосмотичну активність, хоча й різного напрямку.

Так, білково-пептидні гормони (вазопресин, опіати, пролактин, АКТГ, ПТГ, кальцитонін) дозозалежно зменшували часи релаксації протонів води у нирковій тканині, визивали дегідратацію тканини, зменшуючи в ній кількість води (мал.2).

Стероїдні гормони (альдостерон, тестостерон, прогестерон), в основному, підвищували подовжню (Т1) та поперечну (Т2) релаксацію протонів тканинної води. Але кожний гормон виявляв строго індивідуальну спрямованість. Наприклад, альдостерон у своєму органі-мішені - нирках - Т1 збільшував майже в два рази, тоді як Т2 - зменшував; прогестерон при малих концентраціях також підвищував Т1 та зменшував Т2, що вказує на формування кристалічної фракції води біля структуростворюючих факторів. При великих концентраціях прогестерон, навпаки, знижував час релаксації у нирковій тканині, мало місце зменшення кількості гідрованої води, намітилась тенденція до дегідратації тканини.

На відміну від пептидних гормонів, стероїдні гормони (крім прогестерону у великій концентрації) визивали значну гідратацію ниркової тканини (мал.1).

У мозку стероїдні гормони вели себе так само, як і у нирках, тобто визивали її гідратацію, збільшували час релаксації протонів тканинної води, засвідчуючи про ущільнювання гідрованого шару.

Пептидні гормони при малих концентраціях, в основному, визивали гідратацію тканин мозку, тоді як з її ростом ефект був протилежним: спостерігалася дегідратація тканини з пере-

розподілом внутрішньоклітинної води у позаклітинний простір. Необхідно зазначити, що дія пептидних гормонів на водну фракцію мозкової тканини не так рівнозначна, як стероїдів. Наприклад, при односпрямованому кінцевому ефекті на мозок, АКТГ збільшував кристалічну фракцію позаклітинної води, тоді як ПТГ спонукав росту кристалічної фракції внутрішньоклітинної води. Дійсно, існують данні про наявність двох кристалічних фаз у фосfolіпідній системі мозку (Антонченко В.Я. і співавт., 1991).

Виявлена нами чітка диференціація в характері впливу, який залежить від хімічної природи, поширює наші уявлення про клітинні механізми гормональної дії.

На жаль, нема експериментальних доказів підтвердження проникнення гормонів білкової природи у клітину, також, як і дії стероїдних гормонів через системи внутрішньоклітинних рецепторів. Однак, існує механізм, який забезпечує швидку (метаболічну) дію стероїдних гормонів та повільну (ростову на рівні клітинного ядра) - пептидних гормонів. І наші дослідження це підтвердили.

Час інкубації (30 хвил.) тканини в присутності стероїдних гормонів недостатній, щоб пояснити гідроосмотичні ефекти стероїдів по їх класичному механізму дії через ядерний геном. Альдостерон у нашому експерименті продемонстрував свою здібність змінювати іони натрія на іони калія в інкубаційному середовищі (Шрейбер В., 1987), при цьому спостерігалось переміщення тканинної води в сторону внутрішньоклітинної, відбувалася різка гідратація тканини. Динаміка спін-спінової та спін-рішетчатої релаксації засвідчувала про формування кристалічної фракції тканинної води. Однак, офіційно визнано неясним, яким

чином збільшення рівня мРНК (котре альдостерон викликає на рівні транскрипції) приводить до виявлення його мінералокортикоїдного ефекту (Данн М., 1987).

Якщо б ми працювали не з нирковими зрізами, без встановленого часу інкубації та досліджували б тільки цей гормон із стероїдного ряду, то отримавши описані вище результати, узгоджені з його ренальними ефектами, могли б не звертати уваги на те, що одержані ефекти метаболічного характеру, а ніяк не ростового.

Досліджені нами інші стероїдні гормони (прогестерон і тестостерон), натрій - та діуретична активність котрих пояснюється складовою частиною протеанаболічної дії на рівні цілого організму (Шрейбер В., 1987), в *in vitro* умовах безпосередньо також збільшували вихід в інкубаційне середовище калію та знижували - натрію, викликали гідратацію тканини, сприяли формуванню кристалічної фракції води. Дегідратація у ниркових зрізах при великих дозах прогестерону являється за думкою інших дослідників (Бреннер Б. із співавт., 1983) неспецифічним і відображує токсичний ефект.

Про ренотропну дію тестостерону відомо, але його механізм дії визначено ще неостаточно (Brown D., 1993).

У нашому експерименті тестостерон виявив швидко (метаболічну) дію з чіткою кореляцією між збільшенням маси ниркових зрізів, часом релаксації протонів тканинної води і процентної кількості її внутрішньоклітинної фракції. При цьому його гідратуєчий ефект набагато перевищував такий альдостерону.

Динамічні процеси в таких нелінійних системах, як водні системи, приводять до хаотизації посування, або, навпаки, до його

упорядкування й появі просторово-часових структур, які можуть спостерігатися на певному часовому інтервалі ( Антонченко В. і співавт., 1991). Дійсно, всі досліджені нами гормони, викликали у нирковій та мозковій тканині зміну часу релаксації протонів тканинної води. Цілком можливо, що зміни часу релаксації в водних системах зв'язані не стільки зі структурними перебудовами самої води, а скільки зі змінами її мікроструктури у взаємодії з розчинними осмотично активними речовинами ( Антонченко В. і співавт., 1991). І в цьому плані нас дуже зацікавила поведінка натрія у наших дослідженнях.

Відомо, що пересування одновалентного катіона натрія дуже залежить від того, в якому становищі знаходиться вода. Якщо гідратна вода знаходиться в твердому становищі (покої), то мембранна вода має льодоподібну структуру, а провідність мембрани для іонів натрію буде низькою. А якщо гідратна вода переходить у рідке становище, то пересування іона натрія зростає на 5-6 порядків (Анісімов М. і співавт., 1981).

Пептидні гормони викликають перехід мембранної води з квазікристалічного становища в рідке компактно-пакувальне. При цьому, вони не проникають до клітини і дегідратують тканини, завдяки перерозподілу внутрішньоклітинної води до позаклітинної. Також спостерігається зріст пересування іонів натрія, його транспорту у міжклітинний простір.

Стероїдні гормони, завдяки рідкокристалічній природи плазматичної мембрани, вільно проникаючи у середину клітини, не порушують льодоподібну структуру води мембранних білків. Скоріше вони служать іонофорами, які переносять протони поза ліпідний шар мембран, на що вказує зміна протонного обміну та пов'язаний з цим процесом транспорт натрія. Саме цим механіз-

мом можливо пояснити швидку метаболічну дію стероїдних гормонів на тканину, що приводить до її гідратації, перерозподілу позаклітинної води до клітини. На відміну від пептидних гормонів, стероїдні сприяли упорядкуванню тканинної води, формуванню її гідрованого шару, а в деяких випадках й кристалічної фракції.

Виявлена нами спрямованість гідроосмотичних ефектів біологічно-активних речовин може бути використана при розробці нових контрастних агентів, менш токсичних, релаксаційно ефективних та тканинносPECIFIC. Серед досліджених гормонів, як найбільше ЯМР-активними, були визначені такі: тестостерон (10 нмоль/л), бета-ендорфін (0,19 пмоль/л, 1,9 пмоль/л), синт. тирозин-феніл-аланін (N95)- для нирок й для мозку - пролактин (200 мкМО/мл), прогестерон (10 пмоль/л; 50 пмоль/л), тестостерон (10 нмоль/л).

Таким чином, одержані результати вказують на наявність молекулярно-структурної ролі тканинної води в специфічності, генералізації, системній кооперативній реорганізації плазматичної мембрани під впливом гормонального сигналу.

### Висновки.

1. Вазопресин з підвищенням концентрації викликає зміну протонного обміну та густини гідрованого шару води, що сприяє дегідратації як ниркових зрізів, так і тканини мозку, яка супроводжується підвищенням проникності мембран для води із внутрішньоклітинного простору ( $P_a$ ) до позаклітинного ( $P_b$ ).
2. Ендогенні опіоїди виявляють гідроосмотичну активність на ниркову тканину (лей-енкефалін < мет-енкефалін < бета-ендорфін), однотипову з вазопресином, але різною за ме-

ханізмом протонного обміну. Рівномірне скорочення часу релаксації вказує на зменшення фракції вільної внутрішньоклітинної води, густини її гідрованого шару.

3. Дія синтетичних опіатів на тканинний транспорт води неоднозначна. Синтетичний тирозин-феніл-аланін (N 95) за всіма концентраціями і синтетичний тирозин-аргінін (N172) при  $5 \times 10^{-6}$  г/л,  $5 \times 10^{-8}$  г/л змінюють рух тканинної води у внутрішньоклітинний простір, про що свідчить подовження часу поперечної та подовжньої релаксації й збільшення маси ниркової тканини, що вказує на протилежність результатів для АДГ та природних опіоїдів. При інкубації ниркових зрізів з синтетичним лей-енкефалін-даларгіном (N 41) при  $5 \times 10^{-6}$  г/л намітилася тенденція до дегідратації тканини, що характерно для експерименту з АДГ та ендогенними нейропептидами.
4. Для білкових та пептидних гормонів (АКТГ, ПТГ, кальцитонін, пролактин) визначений дозозалежний гідроосмотичний ефект, спрямований на дегідратацію ниркової тканини, для якого характерно підвищення швидкості релаксації (як  $1/T_1$ , так і  $1/T_2$ ), зменшення густини гідрованого шару тканинної води. Біекспоненціальний аналіз показав перерозподіл води з внутрішньоклітинного простору в позаклітинний, котрий супроводжується підвищенням виходу в інкубаційне середовище осмотично активних іонів натрію, що припускає його первинність у формуванні периферійної дії гормонів.
5. Для гормонів стероїдної природи (альдостерон, тестостерон) виявлена тенденція до гідратації ниркової та мозкової тканини незалежно від переміщення іонів натрію і калію. Гідроосмотична активність стероїдів супроводжується підвищенням показників спін-рішетчатої релаксації й незначним зни-

- женням - спін-спінової релаксації на фоні ЯМР-результатів в контрольній групі. Це вказує на упорядкований, малорухомий стан тканинної води завдяки синтезу нових білкових молекул, або завдяки іншим структуруючим факторам. Поведінка прогестерона аналогічна для гормонів білкового походження.
6. Вплив біологічно активних пептидів та білків (АКТГ, пролактин, ПТГ, кальцитонін) на ЯМР-релаксацію протонів тканинної води мозку направлено на дегідратацію тканини на фоні підвищеного виходу іонів натрію і калію в інкубаційне середовище.
  7. Виявлена гідроосмотична активність пептидних та стероїдних гормонів вказує на чітку градацію цих речовин по змінюванню фізико-хімічних властивостей тканинної води, що свідчить про наявність протонного механізму і про молекулярно-структурну роль води в гормонокомпетентності клітини.
  8. Гідроосмотичні ефекти ряду гормонів - пролактин (20 мкМЕ/мл), прогестерон (10 пмоль/л, 50 пмоль/л), тестостерон (10 нмоль/л) для тканини мозку і для ниркової тканини - бета-ендорфін (0,19 пмоль/л, 1,9 пмоль/л), синт. тирозин-аргінін (N 172), що направлені на затримку води, можуть дозволити їх використання як природні контрастні агенти в ЯМР-діагностиці.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Бобров В.А., Комаревцева И.А., Орлова Е.А., Комаревцев В.Н., Верник Г.В. Ядерно-магнитно-резонансная релаксация в диагностике эссенциальной гипертензии // Український кардіологічний журнал. -1996. -№3. -с.47-51.
2. Комаревцева И.А., Орлова Е.А. Действие биологически активных пептидов и стероидов на ядерно-магнитно-

- резонансную релаксацию протонов тканевой воды почек *in vitro* // Український біохімічний журнал.- 1996.- N4. -с. 92-96.
3. Орлова Е.А. Сравнительное влияние природных и синтетических опиатов на ЯМР-показатели почечной ткани // В сборнике НДЦ. -Луганск, 1996.- -с.103-105.
  4. Орлова Е.А. Изучение магнитнорелаксационных характеристик ряда гормонов на транспорт тканевой воды в почечной ткани // В сборнике НДЦ.- Луганск, 1996. -с.88-91.
  5. Орлова О.А., Комаревцева І.О., Кузнецова О.В. Вплив стероїдів на показники ЯМР-релаксації протонів тканинної води нирок *in vitro* // Тез. І з'їзду Укр.біоф.товариства.-Київ, 1994.- N 219.-с.177.
  6. Орлова Е.А. Изучение гидроосмотических эффектов кальцитонина на уровне почки *in vitro* методом ЯМР-релаксометрии // У зб.: Мат. міжнар. конференції з актуальних питань морфології. -Тернопіль, 1996.- -с.489.
  7. Орлова Е.А. Действие тестостерона на ЯМР-релаксацию протонов тканевой воды почек // У зб. тез молодых ученых та спеціалістів. -Луганськ, 1996.-с.112.
  8. Орлова Е.А., Кузнецова Е.В., Комаревцева И.А., Романенко И.Ю. Зависимость T1-и T2-показателей времен релаксации протонов тканевой воды мозга и почек от концентрации пролактина в инкубационной среде // В сб.:Экологические проблемы промышленного региона с точки зрения врача. - Луганск, 1993. -с.102-103.
  9. Орлова О.А., Кузнецова О.В., Комаревцева І.О., Китачаєва З.Б., Сенчий В.М. Порівняльні магнітнорелаксаційні характеристики ниркової тканини під впливом  $\beta$ -ендорфіна та АКГГ // Тез.І з'їзду Укр. біоф.товариства. -Київ, 1994.-N 220.-с.177.

10. Орлова Е.А., Кузнецова Е.В., Комаревцева И.А. ЯМР-релаксационные характеристики ткани мозга и почек при инкубации с паратиреоидным гормоном // В сб.: Экологические проблемы промышленного региона с точки зрения врача.- Луганск, 1993 -с.103-104.

#### Анотації

Orlova H. Comparative dynamic aspects of biology activity of hormones on data of NMR-relaxation *in vitro*. The Dissertation for Obtaining a Scientific Degree of Philosophy Doctor ( Biology ) in the Speciality - Biochemistry . Medical University. Lugansk, 1996.

The present experiments were conducted to determine the effects of peptides and steroids hormones mediated changes in normal rat brain and kidneys tissue water distribution on proton relaxation times /T1; T2/with a 20 MHz NMR-pulse-spectrometer /pc 120 Minispec, Bruker.FRG/. It has been possible to determine the dose-dependent hydroosmotic effect of used hormones and to study the mode of different action of peptides and steroids hormones at the molecular structure level.

Орлова Е.А. Сравнительные динамические аспекты биологической активности гормонов по данным ЯМР-релаксометрии *in vitro*.

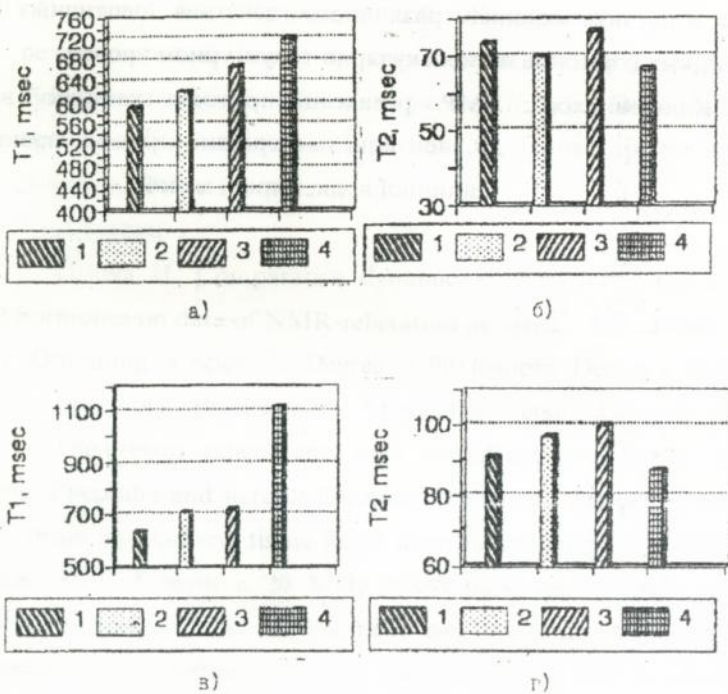
Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности биохимия. Луганский государственный медицинский университет, Луганск, 1996.

Настоящее исследование позволило установить действие пептидных и стероидных гормонов на распределение тканевой воды в мозгу и почках интактных крыс по показателям времени релаксации протонов воды / T1;T2 / с помощью 20 МГц ЯМР-

релаксометра / рс 120 Minispec, Bruker,FRG/. Это дало возможность определить дозозависимый эффект исследованных гормонов и изучить механизм различного действия пептидных и стероидных гормонов на молекулярно-структурном уровне.

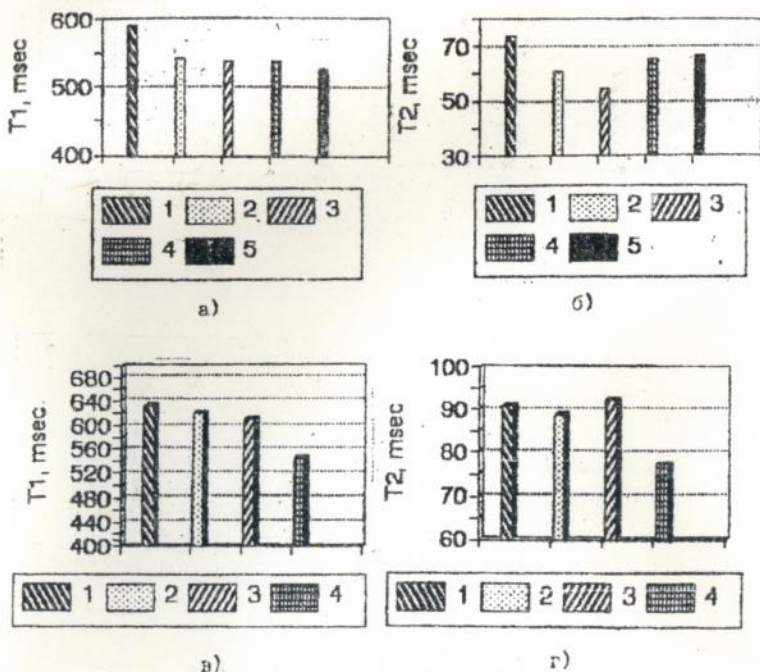
Ключові слова: ЯМР - релаксація протонів тканинної води, пептидні та стероїдні гормони, фракції тканинної води, нирки, мозок.





Мал. I. ЯМР- релаксація протонів тканинної води під впливом стероїдів.

а, б - нирки: 1 - контроль; 2 - прогестерон, 10 пмоль/л;  
 3 - тестостерон, 10 нмоль/л; 4 - альдостерон, 100 пг/мл;  
 в, г - мозок: 1 - контроль; 2 - тестостерон, 10 нмоль/л;  
 3 - прогестерон, 50 пмоль/л; 4 - альдостерон, 100 пг/мл.



Мал. 2. Часи релаксації протонів тканинної води під впливом пептидів.  
 а, б - нірки: 1 - контроль; 2 - АКТГ, 175 пг/мл; 3 - ПТГ, 450 пг/мл; 4 - кальцитонін, 20 пг/мл; 5 - пролактин, 20 мкМЕ/мл.  
 в, г - мозок: 1 - контроль; 2 - ПТГ, 450 пг/мл; 3 - пролактин, 2000 мкМЕ/мл; 4 - АДГ, 80 пг/мл.







АВ. 22.825

---

Формат 60x84/24. Папір офсет. Друк офсетний. Умовн.друк.  
арк.1,5 . Тираж 100 .

Міні-друкарня Регіонального інституту менеджменту,  
348053, м.Луганськ, вул. 50-річ. СРСР, 22-б, к.210.

441479

AB 35.892

AB. 35.892

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
LIBRARY  
540 EAST 57TH STREET  
CHICAGO, ILL. 60637

07/10/2015