

Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В.П.Комісаренка АМН України

На правах рукопису



КОВЗУН Олена Ігорівна

**УЧАСТЬ ЕСТРАДІОЛУ В РЕГУЛЯЦІЇ ГЛЮКОКОРТИКОЇДНОЇ
ФУНКЦІЇ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ**

14.01.14 - ендокринологія біологічна

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

Київ-1996

76.73

1636.216

Дисертація є рукописом

Робота виконана в лабораторії гормонів
Інституту ендокринології та обміну речовин
України

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00757205 (Q)

Науковий керівник:

доктор медичних наук Мікоша Олексій Степанович

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор Трав'янюк Тетяна Давидівна

доктор медичних наук Верхратський Нестор Сергійович

Провідна установа:

Український НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань,
м. Харків

Захист відбудеться "24" грудня 1996 р. о 13 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.23.01 з ендокринології в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України (254114, Київ-114, вул. Вишгородська, 69)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України (254114, Київ-114, вул. Вишгородська, 69)

Автореферат розіслано "20" листопада 1996 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Л.М.Калинська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Розуміння значення та механізмів міжєндокринних зв'язків має зараз нагальну потребу, оскільки, хоч кожна з залоз внутрішньої секреції і має переважний вплив на ефекторний орган, їх діяльність не є надмірно спеціалізованою і більшість процесів знаходиться під регуляторним впливом декількох залоз. Тому з'ясування взаємодії залоз внутрішньої секреції має велике теоретичне і практичне значення. Найбільш висвітленим в літературі є питання про взаємодію гіпофіза і периферичних залоз, проте останнім часом накопичено значний матеріал, що свідчить про наявність прямих зв'язків між самими периферичними ендокринними залозами. В значній мірі пов'язані між собою надниркові залози та яєчники. Ці залози мають спільне ембріональне походження, їх гормони досить близькі за будовою.

В останні роки спостерігається поступова відмова від уявлень про виключну роль АКГГ та ангіотензину II в регуляції функції надниркових залоз. Виявлено дуже велику кількість фактів, що свідчать про існування інших потенційних регуляторів адренкортикальної функції, серед яких є і естрогени. До недавнього часу кору надниркових залоз не відносили до органів-мішеней естрогенів, проте поступово накопичено багато розрізної інформації, яка свідчить, що естрадіол здатний як до безпосереднього впливу на кору надниркових залоз, так і до опосередкованого через модуляцію ефектів агоністів. Існування в специфічних органах-мішенях механізму, що дозволяє сприймати інформацію, яка переноситься естрогенами, дозволяє припустити наявність подібного механізму також для інших органів і тканин, зокрема надниркових залоз.

Проте в цілому значення та механізми впливу естрогенів на функцію кори надниркових залоз залишаються нез'ясованими.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Мета роботи. Дослідження ролі естрадіолу в регуляції фундаментальних метаболічних процесів та стероїдогенезу в корі надниркових залоз.

Основні завдання дослідження:

1. В умовах моделювання різного рівня естрогенів у щурів вивчити стероїдогенез та стан холестеринового депо в надниркових залозах.
2. Вивчити вплив естрадіолу на рецепцію тропних гормонів ізольованими адренкортикоцитами та мікросомальною фракцією кори надниркових залоз.
3. Дослідити фундаментальні метаболічні процеси, що забезпечують функціонування кори надниркових залоз: біосинтез ДНК, РНК і білка в умовах зміни функції яєчників.
4. Оцінити можливість участі пролактину в опосередкуванні дії естрадіолу на кору надниркових залоз.

Наукова новизна досліджень. В цій роботі вперше досліджено вплив різного рівня естрадіолу на рецепцію тропних гормонів в корі надниркових залоз, проаналізовано можливість як прямої дії естрогенів на надниркові залози, так і її опосередкування пролактином, а також залежність характеру змін основних метаболічних процесів від строку після оваріектомії.

Науково-практична значимість роботи. Робота дозволяє в певній мірі оцінити значення естрадіолу в регуляції адренкортикальної функції і зробити припущення щодо можливих механізмів впливу естрадіолу на адренкортикоцити та окрім того розширити розуміння деяких причин порушень функції надниркових залоз при патології яєчників.

Основні наукові положення, що виносяться на захист:

- естрадіол має суттєвий анаболічний вплив на метаболізм ДНК, РНК і білка в корі надниркових залоз щурів, що найбільш виразно проявляється при тривалих строках після оваріектомії.

- специфічне зв'язування тропних гормонів в корі надниркових залоз залежить від рівня естрогенів в організмі: знижується при кастрації та істотно збільшується при заміщувальному введенні естрадіолу.
- стимулюючий ефект естрадіолу на кору надниркових залоз може бути результатом як прямої його дії, так і опосередкованої іншими агоністами, зокрема пролактинном.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано три роботи у вітчизняних журналах.

Апробація роботи. Результати роботи доповідались на науковій конференції в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України (1996).

Об'єм та структура роботи. Дисертацію викладено на 121 сторінці друкованого тексту. Вона складається із вступу, огляду літератури, розділу, присвяченого матеріалам та методам, використаним у роботі, 3-х розділів власних досліджень, обговорення результатів, висновків та списку літератури, який включає 208 джерел, в тому числі 17 вітчизняних та 191 зарубіжних авторів. Роботу проілюстровано 14 рисунками та 5 таблицями.

Декларація особистого внеску дисертанта. Автором особисто виконано дослідження рецепції тропних гормонів, а також метаболічних процесів, що забезпечують функціонування кори надниркових залоз. Разом із провідним науковим співробітником лабораторії гормональної регуляції обміну речовин Челнаковою І.С. визначено вміст 11-оксикортикостероїдів у культуральному середовищі.

ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експерименти проведено на самках щурів лінії Wistar масою 150-200 г (219 щурів), а також на культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят. Двосторонню оваріектомію проводили під ефірним наркозом. Строки після оваріектомії складали 2 та 8 тижнів.

Естрадіол бензоат (Koch-Light, Англія), розчинений у сливовій олії, вводили у дозі 50 мкг на тварину на добу протягом трьох днів.

Ізольовані адренкортикоцити виділяли фракціонуванням в ступеневому градієнті густини перколу [Тронько Н.Д. та ін., 1989].

Для отримання культури клітин тканину надниркових залоз подрібнювали, промивали декілька разів холодним середовищем 199 з антибіотиками і обробляли 0,1% розчином колагенази (Merck, Німеччина) по 30 хв на водяній бані при 37 °С з постійним перемішуванням. Після промивання надосадової суспензії середовищем 199 та фільтрування одержували суспензію адренкортикоцитів. Культивування провадили в термостаті при 37 °С зі зміною середовища через добу після розсіву клітин. Культуру використовували у дослідях на третій день культивування, естрадіол (кінцева концентрація 0,00037-3,7 мкМ) вносили на останні три дні культивування перед дослідом.

Кількісне визначення 11-оксикортикостероїдів в середовищі культивування проводили за методом P. de Moor (1960).

Екстракцію ліпідів проводили за методом Bligh E.G., Dayer W.I. (1959). Екстракцію стероїдів проводили, додаючи до 0,25 мл суспензії адренкортикоцитів трічі по 0,5 мл хлороформу.

Хроматографічне розділення стероїдів проводили за методом двомірної тонкошарової хроматографії на силікагелі КСК. Використовували хроматографічні системи: I напрямок: хлороформ - етанол у співвідношенні 95 : 5; II напрямок: бензол - ацетон у співвідношенні 60 : 40. Для хроматографічного розділення неполярних ліпідів використовували таку систему розчинників: гексан - діетиловий ефір - оцтова кислота у співвідношенні 85 : 15 : 1.

Кількісне визначення холестерину та його ефірів проводили за методом Amenta J.S. (1964).

Зв'язування ^{125}I -АКТГ та ^{125}I -пролактину вивчали за відповідними методиками [Саутин Ю.Ю. та ін., 1989]. Стандартна проба для

визначення зв'язування містила мічений гормон (10^5 імп/хв), 10^5 - 10^6 клітин або 60-100 мкг мікросомального білка.

Визначення білка здійснювалось по зв'язуванню кумасі G-250 [Bradford M.M., 1976] з використанням в якості стандарту сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (Serva, Німеччина).

Кількісне визначення РНК та ДНК в гомогенатах проводили згідно рекомендацій Трудолюбової М.Г. (1977).

Визначення пролактину в сироватці крові щурів проводили за допомогою радіоімунологічного методу.

Результати досліджень було оброблено за допомогою методів варіаційної статистики із застосуванням t-критерію Стьюдента, за непараметричним U-критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні та однофакторним дисперсійним аналізом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення впливу естрадіолу на функцію кори надниркових залоз та аналіз механізмів реалізації цього впливу проводились в дослідях *in vivo* та *in vitro*. Для оцінки впливу естрадіолу на функцію надниркових залоз досліджено змінення швидкості перетворення міченого холестерину в кортикостероїди в надниркових залозах щурів після видалення яєчників.

В результаті проведених досліджень встановлено, що введення естрадіолу кастрованим тваринам призводить до збільшення включення ^3H -холестерину до кортикостерону диспергованими клітинами надниркових залоз порівняно із оваріектомованими тваринами, що отримували ін'єкції олії: $6,6 \pm 0,9$ й $4,2 \pm 0,3$ розпадів/хв на 10^5 клітин відповідно. Подібний, але менш виразний ефект спостерігався також на інтактних тваринах: $3,7 \pm 0,3$ при введенні естрадіолу та $2,8 \pm 0,4$ в контролі. Близьку картину відмічено при визначенні мічення альдостерону, проте варіабельність показників не дозволила статистично підтвердити наявність змін.

Внаслідок оварієктомії також спостерігалось посилення включення ^3H -холестерину в кортикостерон та альдостерон. Це спостереження на перший погляд протирічить результатам попередніх дослідів. Проте це протиріччя пояснилось в подальших дослідженнях. Вивчено вміст холестерину в корі надниркових залоз щурів після оварієктомії. Аналіз стану холестеринового депо в корі надниркових залоз показав, що видалення яєчників призводить до чіткого зниження вмісту вільного холестерину, який є попередником синтезу кортикостероїдів. Якщо вміст холестерину у інтактних тварин становив $12,5 \pm 1,2$ мкг/мг тканини, то через 8 тижнів після оварієктомії він знизився майже удвічі та становив $7,3 \pm 0,4$ мкг/мг тканини. В результаті оварієктомії майже на третину зменшився також вміст ефірів холестерину, який у інтактних тварин становив $46,3 \pm 5,9$ мкг/мг тканини, а у оварієктомованих - $32,3 \pm 6,7$ мкг/мг тканини. Суттєве зниження вмісту холестерину у оварієктомованих тварин може призводити до посилення включення міченого холестерину в стероїдні гормони тканиною надниркових залоз в дослідях *in vitro*, що може пояснити посилення мічення кортикостероїдів при кастрації.

Подальше вивчення впливу естрадіолу на функцію надниркових залоз, зокрема на синтез сумарних 11-оксикортикостероїдів, було проведено *in vitro* на первинній культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят. Хоч концентрація естрадіолу $3,7$ мкМ давала найбільш виражений ефект, навіть 37 нМ гормону призводили до активації синтезу 11-ОКС первинною культурою клітин надниркових залоз (рис. 1).

Виявлений стимулюючий вплив естрадіолу на синтез 11-ОКС може бути наслідком прямої дії гормону на надниркові залози. Про прямий вплив естрогенів на кору надниркових залоз свідчить також той факт, що естрон може *in vitro* посилювати утворення гідрокортизону тканиною надниркових залоз гвінейської свинки [Юдаев Н.А., Микоша А.С., 1963]. Подібне явище спостерігалось також на надниркових

залозах людей: естрадіол викликав стимуляцію секреції кортизолу в умовах відсутності АКТГ в культурі клітин надниркових залоз [Caticha O. et al., 1993].

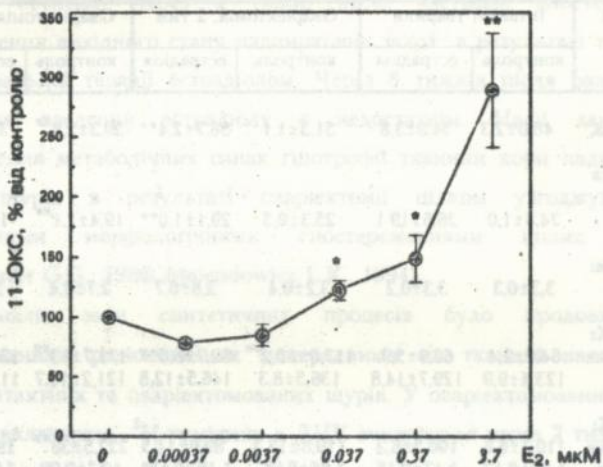


Рис. 1. Вплив естрадіолу *in vitro* на синтез 11-оксикортикостероїдів первинною культурою надниркових залоз новонароджених поросят

*, ** - вірогідний вплив естрадіолу ($p < 0,05$; $p < 0,01$ відповідно); t - критерій; $n=4$.

Аналіз літературних даних вказує на те, що естрогени здатні викликати ряд функціональних змін, впливаючи на синтез та обмін нуклеїнових кислот та білка, використовуючи як геномний, так і негеномний шляхи. Для оцінки впливу естрогенів на обмін нуклеїнових кислот та білків ми визначили їх вміст в тканині надниркових залоз.

Показники метаболічних змін в корі надниркових залоз шурів наведено в табл. 1. Через 2 тижні після кастрації абсолютна маса надниркових залоз та її відношення до маси тіла не змінюється. Проте через 8 тижнів після оваріектомії спостерігається зниження маси надниркових залоз і відношення маси залоз до маси тіла. В обох групах оваріектомія викликала дворазове збільшення вмісту ДНК з розрахунку

Маса надниркових залоз і вміст білка, ДНК та РНК у інтактних та оварієктомованих щурів в контролі та при введенні естрадіолу

($M \pm m$)

Показники	Інтактні тварини		Оварієктомія, 2 тиж		Оварієктомія, 8 тиж	
	контроль	естрадіол	контроль	естрадіол	контроль	естрадіол
Маса залоз, мг	48,0±2,3	54,9±3,8	51,3±1,1	58,7±2,4**	39,3±2,8**	37,3±1,3
Індекс: маса залоз / маса тіла, мг/100 г	24,4±1,0	26,6±1,9	25,3±0,5	29,1±1,0**	19,4±1,1**	16,2±0,1
Вміст білка: мг/100 мг тканини	3,3±0,3	3,3±0,2	3,2±0,4	3,8±0,7	2,7±0,4	2,2±0,1
Вміст ДНК: мкг/мг білка	64,6±2,4	62,9±5,9	117,0±15,2**	62,7±8,0**	131,7±13**	134,9±17,8
мкг на залозу	123,4±9,9	129,7±14,8	136,5±8,3	146,5±12,8	121,2±12,7	112,2±11,6
Вміст РНК: мкг/мг білка	110,1±6,6	100,5±6,3	119,8±13,3	89,0±14,5	222,5±33**	199,1±9,5
-РНК/ДНК	1,30±0,12	1,47±0,15	1,05±0,06*	1,40±0,13*	1,47±0,09	1,72±0,23
n	12	9	12	6	12	3

*, ** - вірогідний вплив оварієктомії ($p < 0,05$; $p < 0,01$ відповідно); * ** - вірогідний вплив естрадіолу ($p < 0,05$; $p < 0,01$ відповідно) за t -критерієм Стьюдента; n - кількість спостережень.

на білок. Проте збільшення вмісту РНК з розрахунку на білок спостерігалось лише у тварин, оварієктомованих 8 тижнів тому. З розрахунку на надниркову залозу кількість ДНК та РНК не змінювалась. Ймовірно, знайдені зміни зумовлені зменшенням об'єму клітин та гіпотрофією тканини. При введенні естрадіолу інтактним тваринам жоден з параметрів, що розглядалися, не змінювався.

Введення естрадіолу тваринам, що взяті в експеримент через 2 тижні після оварієктомії, викликало зменшення кількості ДНК з розрахунку на білок до контрольних величин поряд зі збільшенням маси надниркових залоз (табл. 1). У тварин, оварієктомованих за 8

тижнів до експерименту, триденних ін'єкцій естрадіолу було недостатньо для відновлення контрольного рівня ДНК. Отже, 2 та 8 тижневі строки оваріектомії викликають атрофію надниркових залоз різного ступеня. Через 2 тижні після кастрації спостерігається відновлення вихідного стану надниркових залоз в результаті триденної заміщувальної терапії естрадіолом. Через 8 тижнів після оваріектомії триденне введення естрадіолу є недостатнім. Наші дані щодо виникнення метаболічних ознак гіпотрофії тканини кори надниркових залоз щурів в результаті оваріектомії цілком узгоджуються з численними морфологічними спостереженнями інших авторів [Nussdorfer G.G., 1986; Malendowicz L.K., 1994].

Аналіз змін синтетичних процесів було продовжено із застосуванням радіоактивних попередників на тканині надниркових залоз інтактних та оваріектомованих щурів. У оваріектомованих тварин *in vitro* включення ^3H -тимідину в ДНК знижується через 2 тижні після операції, а через 8 тижнів повертається до контрольного рівня (табл. 2). Питома радіоактивність ДНК також знижена у тварин, оваріектомованих за 2 тижні до дослідження, але не змінюється у щурів, оперованих за 8 тижнів до дослідження. Під впливом естрадіолу в обох групах оваріектомованих тварин спостерігалось істотне посилення включення ^3H -тимідину в ДНК. Введення естрадіолу оваріектомованим тваринам спричиняло суттєве зростання питомої радіоактивності як через 2, так і через 8 тижнів після операції (табл. 2).

Включення ^3H -уридину в РНК у щурів, оваріектомованих за 2 тижні до дослідження, не змінювалось порівняно до інтактних тварин (табл. 2). Проте через 8 тижнів після оваріектомії спостерігалось значне посилення включення міченого уридину в РНК. Таке підвищення можна пояснити як активацією синтезу РНК, так і зменшенням пулу попередників синтезу РНК у цих тварин. Про зменшення пулу попередників може свідчити зростання питомої радіоактивності РНК у тварин, оваріектомованих за 8 тижнів до експерименту. Під впливом

естрадіолу у тварин, оварієктомованих за 2 тижні до досліджу, включення ^3H -уридину збільшувалось. Через 8 тижнів після оварієктомії посилення включення міченого уридину було ще більш помітним.

Таблиця 2

Включення ^3H -тимідину в ДНК, ^3H -уридину в РНК та ^3H -лейцину в білок зрізами кори надниркових залоз інтактних та оварієктомованих щурів ($M \pm m$)

Показники,	Інтактні тварини		Оварієктомія, 2 тиж		Оварієктомія, 8 тиж	
	контроль	естрадіол	контроль	естрадіол	контроль	естрадіол
розпадів/хв ($\times 10^{-3}$):						
^3H -тимідин:						
- на 100 мг сирої тканини	18,1 \pm 2,7	18,4 \pm 4,3	13,8 \pm 1,6 ^a	21,7 \pm 2,9 ^a	18,8 \pm 1,8	27,8 \pm 2,5 ^a
- на мг ДНК	93,3 \pm 18,3	112,7 \pm 22	45,7 \pm 4,8 ^a	76,4 \pm 9,7 ^a	69,1 \pm 10,6	96,3 \pm 5,3 ^a
^3H -уридин:						
- на 100 мг сирої тканини	7,8 \pm 0,7	7,2 \pm 0,8	8,0 \pm 0,7	10,7 \pm 1,2 ^a	17,7 \pm 3,0 ^a	32,9 \pm 7,2 ^a
- на мг РНК	24,5 \pm 1,8	20,9 \pm 2,1	27,8 \pm 1,3	29,0 \pm 3,4	42,5 \pm 8,5	64,9 \pm 12,3
^3H -лейцин:						
- на 100 мг сирої тканини	10,9 \pm 0,6	10,4 \pm 0,7	17,9 \pm 1,8 ^a	18,3 \pm 1,5	15,4 \pm 0,9 ^a	22,6 \pm 1,8 ^{**}
- на мг білка	3,8 \pm 0,6	3,2 \pm 0,6	7,0 \pm 0,8 ^a	4,3 \pm 0,5	5,5 \pm 0,9 ^a	0,3 \pm 0,7 ^{**}
n	12	9	12	6	12	3

^a - вірогідний вплив оварієктомії ($p < 0,05$); ^a ^{**} - вірогідний вплив естрадіолу ($p < 0,05$; $p < 0,01$ відповідно) за непараметричним U-критерієм; n - кількість спостережень.

Включення ^3H -уридину в РНК з розрахунку на білок залишалось незмінним у щурів, кастрованих за 2 тижні до досліджу, але істотно зростало у тварин, взятих в експеримент через 8 тижнів після оварієктомії. Під впливом естрадіолу посилення включення міченого уридину з розрахунку на білок спостерігалось тільки через 8 тижнів після операції. Проте не встановлено вірогідних змін питомої радіоактивності РНК в обох групах тварин.

В результаті кастрації спостерігалось посилення включення міченого лейцину в білки кори надниркових залоз як через 2, так і через 8 тижнів після операції (табл. 2). Так само змінюються і показники питомої радіоактивності білка. Це може бути результатом зменшення пулу попередників синтезу білка в клітинах залози внаслідок оваріектомії. У тварин, що використовувалися в дослідах по 2 тижнях після оваріектомії, естрадіол не впливав на включення ^3H -лейцину в білки. Через 8 тижнів після оваріектомії під впливом естрадіолу спостерігалось значне посилення включення міченого лейцину. Введення естрадіолу інтактним тваринам не викликало статистично достовірних змін включення ^3H -тимідину, ^3H -уридину, ^3H -лейцину. Отримані дані свідчать, що естрадіол має анаболічну дію на метаболізм ДНК, РНК та білка в корі надниркових залоз оваріектомованих щурів.

Посилення синтезу ДНК під впливом естрадіолу *in vivo* було продемонстровано також на ізольованих ядрах печінки [Димитров О.А. та ін., 1987]. Здається, саме здатність естрадіолу до стимуляції біосинтезу нуклеїнових кислот і білків зумовлює відновлення маси надниркових залоз та їх морфологічних характеристик при заміщувальній гормонотерапії естрогенами у оваріектомованих тварин. Цікаво, що ми не спостерігали подібної стимуляції анаболізму ДНК, РНК і білка при введенні естрадіолу інтактним тваринам. Ймовірно, чутливість кори надниркових залоз інтактних тварин до впливу естрогенів значно нижча, ніж у оваріектомованих, тому триденного введення естрадіолу в такій дозі було недосить для прояву його ефектів. Проте це можна пояснити також пригніченням синтезу ендогенного естрадіолу за принципом зворотнього зв'язку, внаслідок чого рівень гормону в крові залишався незмінним.

Вплив естрадіолу на кору надниркових залоз може бути як прямим, так і опосередкованим. Раніше нами описана зміна синтезу 11-кетокортикостероїдів при додаванні естрадіолу до середовища

культивування клітин надниркових залоз. Можливість прямої дії естрадіолу на надниркові залози також підтверджують наші дані щодо стимуляції включення міченого тимідину в ДНК первинною культурою надниркових залоз новонароджених поросят внаслідок додавання естрадіолу до інкубаційного середовища. Посилення включення міченого тимідину в ДНК спостерігалось вже при концентрації естрадіолу 37 нМ (рис. 2). При концентрації гормону 0,37 мкМ та 3,7 мкМ таке посилення ставало ще більшим.

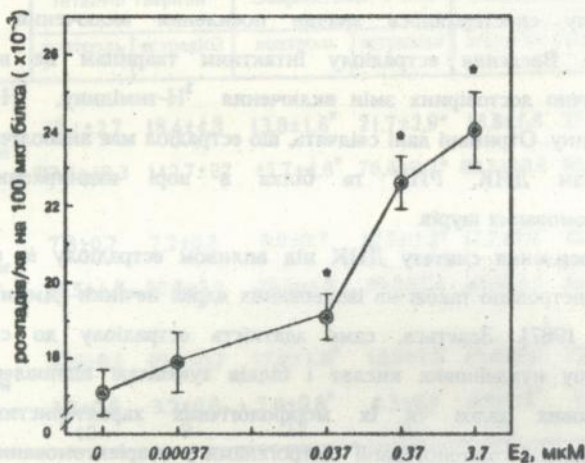


Рис. 2. Вплив естрадіолу *in vitro* на включення ³H-тимідину в ДНК первинною культурою надниркових залоз новонароджених поросят

* - вірогідний вплив естрадіолу ($p < 0,05$); t-критерій; $n=3$.

Оскільки рецепція агоністів - один з найважливіших етапів регуляції функції кори надниркових залоз, уявлялося доцільним вивчити вплив естрадіолу на зв'язування міченого АКТГ мікросомами кори надниркових залоз.

Оваріектомія спричиняла суттєве зниження зв'язування ¹²⁵I-АКТГ мікросомальною фракцією кори надниркових залоз щурів. Якщо зв'язування у інтактних тварин становило $1,8 \pm 0,2$ В_{sp}/100 мкг білка, то

через 8 тижнів після оваріектомії зв'язування зменшилось удвічі і становило лише $0,9 \pm 0,1$ В_{sp}/100 мкг білка (рис. 3).

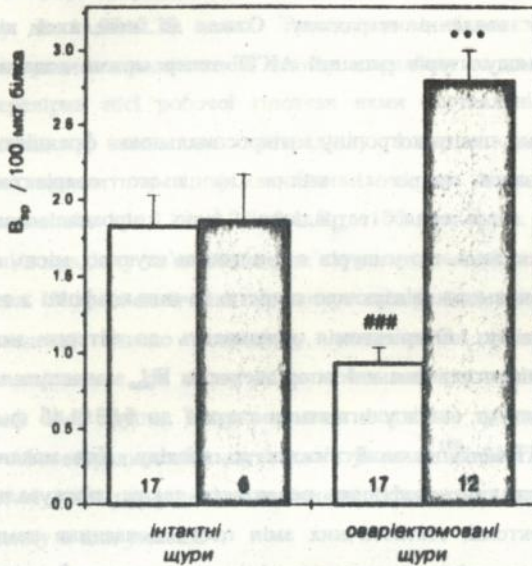


Рис. 3. Зв'язування ^{125}I -АКТГ мікросомами кори надниркових залоз інтактних та оварієктомованих щурів

Світлі стовпчики - контроль без естрадіолу; заштриховані - введення естрадіолу. *** - вірогідний вплив естрадіолу ($p < 0,001$); ### - вірогідний вплив оваріектомії ($p < 0,001$); t-критерій. Кількість спостережень вказано всередині стовпчиків.

В результаті проведених досліджень встановлено, що заміщувальне введення естрадіолу кастрованим тваринам вже через три дні призводить до збільшення зв'язування ^{125}I -АКТГ порівняно до тварин, що отримували олію: відповідно $2,8 \pm 0,2$ та $0,9 \pm 0,1$ В_{sp}/100 мкг білка. Проте введення естрадіолу виявилось неефективним у щурів з інтактними яєчниками: $1,83 \pm 0,2$ при введенні естрадіолу та $1,87 \pm 0,3$ у контролі (рис. 3).

Таким чином, специфічне зв'язування АКТГ, основного регулятора функції надниркових залоз, залежить від рівня статевих гормонів: знижується при оварієктомії та істотно збільшується при заміщувальному введенні естрадіолу. Отже, до невеликої кількості відомих зараз модуляторів рецепції АКТГ тепер можна додати також естрадіол.

Зв'язування кортикотропіну мікросомальною фракцією кори надниркових залоз щурів і вплив на нього оварієктомії та заміщувального введення естрадіолу було проаналізовано за Скетчардом. Виявлено, що у щурів є 2 класи зв'язуючих місць АКТГ - високоафінні з низькою зв'язуючою ємністю та низькоафінні з високою зв'язуючою ємністю. Оварієктомія призводить до чіткого зниження концентрації рецепторів низької спорідненості. V_{max} зменшувалась від $10,42 \pm 0,92$ фмоль/мг білка у інтактних тварин до $6,83 \pm 1,45$ фмоль/мг білка у оварієктомованих за 8 тижнів до досліджу. Хоч максимальна зв'язуюча ємність високоафінних рецепторів також знижувалась під впливом оварієктомії, статистичних змін цього показника немає. Під впливом заміщувального введення естрадіолу вже через 3 дні суттєво підвищувалась концентрація як низькоафінних зв'язуючих місць (від $6,83 \pm 1,45$ фмоль/мг білка у групі оварієктомованих щурів до $10,58 \pm 0,79$ фмоль/мг білка у групі оварієктомованих щурів, що отримували ін'єкції естрадіолу), так і високоафінних (від $1,46 \pm 0,33$ фмоль/мг білка у групі оварієктомованих щурів до $2,71 \pm 0,44$ фмоль/мг білка у групі оварієктомованих щурів, що отримували естрадіол). Інші параметри зв'язування залишались практично незмінними. Це дає підставу висловити припущення, що посилення зв'язування АКТГ під впливом естрадіолу відбувається за рахунок збільшення кількості доступних рецепторів.

В літературі є дані про те, що оварієктомія або введення естрадіолу спричиняють значний вплив на рівень пролактину в крові. Ми показали, що у інтактних щурів концентрація пролактину в крові

становила $2,69 \pm 0,37$ нг/мл. У озарієктомованих тварин вона зменшилась більш ніж удвічі і становила $1,08 \pm 0,28$ нг/мл. Триденне введення естрадіолу інтактним тваринам викликало збільшення рівня гормону до $11,27 \pm 2,27$ нг/мл. Таким чином, з'являється можливість опосередкування пролактином впливу естрадіолу на надниркові залози. Для перевірки цієї робочої гіпотези нами поставлені досліди з одночасним введенням естрадіолу і парлоделу, котрий блокує секрецію пролактину гіпофізом. Виявилось, що естрадіол збільшував зв'язування від $1,1 \pm 0,1$ до $2,8 \pm 0,4$ В_{sp}/100 мкг білка. При сумісному введенні естрадіолу та парлоделу зв'язування становило $3,5 \pm 0,3$ В_{sp}/100 мкг білка. Хоч ця величина перевищує зв'язування, яке спостерігається при введенні одного естрадіолу, статистичної різниці між цими величинами немає. На жаль, ми не могли визначити рівень пролактину у тварин цієї групи. Тому можлива подвійна трактовка отриманих даних. Або естрадіол збільшував зв'язування ^{125}I -АКТГ незалежно від пролактину, або парлодел не викликав суттєвого гальмування секреції пролактину в цих умовах.

Цікаво співставити вплив парлоделу на зв'язування ^{125}I -АКТГ та на біохімічні показники. Так само як і в попередніх дослідях, естрадіол підвищував рівень ДНК в тканині та включення ^3H -тимідину в ДНК (табл. 3). Цей ефект зникав, якщо тваринам на фоні естрадіолу вводили парлодел. Пролактин впливав на рівень та мічення ДНК подібно до естрадіолу. Таким чином, можна припустити, що в організмі вплив естрадіолу хоча б частково опосередкується пролактином.

В той же час можна припустити, що вплив естрадіолу на зв'язування АКТГ, так само як і вплив гормону на масу залози, здійснюється незалежно від пролактину, хоч пролактин сам здатен збільшувати зв'язування АКТГ, масу залози, вміст ДНК та її мічення тимідином.

Вплив естрадіолу, парлоделу та пролактину на вміст ДНК та РНК в тканині та включення ³H-тимідину зрізами кори надниркових залоз щурів через 8 тижнів після оваріектомії

(M ± m, n=6)

Показники	Контроль	Естрадіол	Парлодел	Парлодел+ естрадіол	Пролактин
Маса залоз, мг	38,7±0,7	42,3±3,7	40,7±1,5	47,3±1,7 ⁶⁶	46,7±1,9 ^{**}
Індекс: маса залоз / маса тіла, мг/100 г	20,1±1,2	22,0±1,5	23,3±1,0	26,4±0,8 ⁶⁶	22,2±1,0
Вміст білка:					
мг/100 мг тканини	2,7±0,1	3,0±0,2	3,8±0,5 [*]	3,1±0,3	3,3±0,3 [*]
Вміст ДНК:					
мкг/100 мг тканини	307±13	364±19 [*]	329±22	290±19 ⁶⁶	454±44 [*]
Вміст РНК:					
мкг/100 мг тканини	457±25	491±24	559±80	402±43 [*]	469±39
³ H-тимідин:					
розпадів/хв (x10 ⁻³):					
-на 100 мг тканини	20,1±0,6	27,3±1,1 ^{**}	21,8±1,5	22,7±1,3 ⁶⁶	30,3±3,2 ^{**}
-на мг ДНК	62,1±4,3	75,8±4,7 [*]	67,4±5,2	80,6±8,0	72,9±13,4

* ** - вірогідний вплив естрадіолу, * ** - вірогідний вплив парлоделу, порівняно з показниками групи, що отримувала естрадіол; *, ** - вірогідний вплив пролактину (p<0,05; p<0,01 відповідно); * - вірогідний вплив парлоделу, порівняно з показниками контрольної групи (p<0,05); ⁶⁶ - вірогідний одночасний вплив парлоделу та естрадіолу (p<0,01) за t-критерієм Стьюдента.

При дослідженні впливу естрогенів на зв'язування ¹²⁵I-пролактину встановлено, що оваріектомія спричиняє суттєве зниження зв'язування ¹²⁵I-ПРЛ мікросомальною фракцією надниркових залоз щурів. Через 8 тижнів після кастрації порівняно до інтактних тварин специфічне зв'язування становило 4,1±0,8 й 7,3±0,6 В_{sp}/100 мкг білка відповідно. Заміщувальне введення естрадіолу вже через три дні викликало у оваріектомованих тварин посилення зв'язування ¹²⁵I-ПРЛ до 7,6±0,8 В_{sp}/100 мкг білка. Введення естрадіолу інтактним тваринам виявилось неефективним. Отже, специфічне зв'язування ¹²⁵I-ПРЛ, важливого модулятора активності надниркових залоз, суттєво знижується при оваріектомії та збільшується при заміщувальному введенні естрадіолу.

Аналіз за Скетчардом показав, що в результаті оварієктомії кількість рецепторів пролактину стає значно меншою. V_{max} знизилось від $1,1 \pm 0,07$ нмоль/мг білка у інтактних тварин до $0,31 \pm 0,08$ нмоль/мг білка у кастрованих, проте афінність рецепторів до пролактину у цих групах вірогідно не змінювалась ($0,17 \pm 0,02$ нмоль у групі інтактних тварин; $0,33 \pm 0,18$ нмоль у групі оварієктомованих тварин).

Для оцінки прямого впливу естрогенів на зв'язування пролактину були використані ізольовані адренкортикоцити кори надниркових залоз інтактних та оварієктомованих щурів, на яких визначали залежність рецепції ^{125}I -ПРЛ від різних концентрацій естрадіолу (в діапазоні 37 нМ - 37 мкМ). 4-годинна інкубація клітин з естрадіолом дозволила виявити суттєве посилення специфічного зв'язування ^{125}I -ПРЛ адренкортикальними клітинами оварієктомованих щурів. Рецепція пролактину адренкортикоцитами інтактних тварин не змінювалась з підвищенням концентрації естрадіолу.

Отже, естрогени здатні впливати на найважливіші етапи регуляції функції кори надниркових залоз - зв'язування АКГГ та пролактину в надниркових залозах, синтез ДНК, РНК і білка, стероїдогенез, і, таким чином, беруть участь в регуляції функції кори надниркових залоз.

ВИСНОВКИ

1. Внаслідок видалення яєчників у щурів спостерігається зменшення маси надниркових залоз. Зростання вмісту ДНК з розрахунку на білок поряд із незмінністю вмісту ДНК з розрахунку на залозу свідчить про атрофію надниркових залоз за рахунок зменшення об'єму адренкортикоцитів. Ступінь атрофії надниркових залоз збільшується зі збільшенням строку після оварієктомії.
2. Триденне введення естрадіолу кастрованим щурам спричиняє значне збільшення маси надниркових залоз через 2 тижні після оварієктомії. Через 8 тижнів після оварієктомії триденного введення естрадіолу недосить для відновлення вихідного стану надниркових залоз.

3. Оваріектомія призводить до значного зниження вмісту холестерину та його ефірів в корі надниркових залоз.
4. Включення мічених попередників синтезу кортикостероїдів у кастрованих тварин не свідчить про змінення стероїдогенезу. Під впливом естрадіолу спостерігається посилення стероїдогенезу в корі надниркових залоз.
5. Специфічне зв'язування тропних гормонів (^{125}I -АКТГ, ^{125}I -ПРЛ) мікросомальною фракцією кори надниркових залоз знижується при кастрації та істотно зростає при замшувальному введенні естрадіолу.
6. Інкубація з естрадіолом ізольованих адренкортикоцитів оваріектомованих щурів викликає посилення зв'язування ^{125}I -ПРЛ.
7. Результатом введення естрадіолу кастрованим тваринам було посилення включення ^3H -тимідину, ^3H -уридину та ^3H -лейцину в ДНК, РНК та білок відповідно. Отримані дані свідчать, що естрадіол викликає виразну анаболічну дію на метаболізм ДНК, РНК і білка, особливо чітко виражену при тривалих строках після оваріектомії. Це свідчить про плейотропну дію гормону на кору надниркових залоз.
8. Введення парлоделу перешкоджає проявленню дії естрадіолу на біосинтез ДНК, що вказує на можливість участі пролактину в опосередкуванні ефектів естрадіолу *in vivo*.
9. Стимулюючий вплив естрадіолу на біосинтез ДНК, котрий оцінювався за включенням тимідину на культивованих клітинах надниркових залоз, пропорційний концентрації гормону. Це свідчить про можливість прямої дії естрадіолу на надниркові залози.
10. Модулюючи зв'язування АКТГ та пролактину клітинами кори надниркових залоз та змінюючи ряд фундаментальних біохімічних характеристик, естрогени можуть брати участь в регуляції функцій кори надниркових залоз.

Перелік публікацій по темі дисертації

1. Вивчення впливу оварієктомії на метаболізм ДНК, РНК і білка в корі надниркових залоз щурів // Фізіологічний журнал. - 1996. - т. 42, № 1-2 - С. 53-58

2. Шляхи внутрішньоклітинного перенесення регуляторних сигналів пролактину та іонів калію у клітинах кори надниркових залоз // Ендокринологія - 1996. - т. 1, № 1. - С. 5-13 (співавт. Тронько М.Д., Саутін Ю.Ю., Пушкарьов В.М., Челнакова І.С., Мікоша О.С).

3. Участь пролактину в реалізації дії естрадіолу на кору надниркових залоз щурів // Ендокринологія. - 1996. - т. 1, № 1. - С. 116-118 (співавт. Мікоша О.С).

АННОТАЦІЯ

Ковзун Е.И. *Участие эстрадиола в регуляции глюкокортикоидной функции коры надпочечников.*

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.14 - эндокринология биологическая. Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П.Комиссаренко АМН Украины, Киев 1996.

Защищается работа по исследованию регуляторного воздействия эстрадиола на функцию коры надпочечных желез. Анализ механизмов реализации эффектов эстрадиола проводился в опытах *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что стероидогенез, оцениваемый по включению меченого холестерина в кортикостероиды диспергированными адренокортикоцитами, усиливается под влиянием эстрадиола. Синтез 11-оксикортикостероидов и биосинтез ДНК, оцениваемый по включению меченого тимидина, возрастают при добавлении эстрадиола к культивируемым клеткам надпочечных желез, что свидетельствует о прямом действии гормона на адренокортикоциты. Проанализирована также возможность опосредования пролактином действия эстрадиола на кору надпочечников *in vivo*. Специфическое связывание тропных гормонов резко снижается вследствие оваризктомии и существенно возрастает при заместительном введении эстрадиола. Под влиянием эстрадиола изменяется ряд фундаментальных биохимических характеристик:

усиливается биосинтез ДНК, РНК и белка, что свидетельствует о пролиферативном воздействии гормона на кору надпочечников

SUMMARY

Kovzun E.I. The role of estradiol in the regulation of glucocorticoid function of adrenal cortex.

Thesis for the Degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 14.01.14 - biological endocrinology; V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 1996.

The work aimed at the research of the regulatory effect of estradiol on the function of adrenal cortex is submitted. Analysis of the mechanisms of realization of estradiol effects was carried out in vivo and in vitro. It was determined that steroidogenesis estimated according to the uptake of labelled cholesterol in corticosteroids by dispersed adrenocorticocytes, intensified under the influence of estradiol. Production of 11-hydroxycorticosteroids and biosynthesis of DNA assessed by uptake of the labelled thymidine increase with an addition of estradiol to the cultivated adrenal cells. There are the evidence for direct action of hormone on adrenocorticocytes. The possibility of mediated estradiol effect on adrenal cortex by prolactin in vivo was also considered. Specific binding of trophic hormones decreased sharply in consequence of ovariectomy and increased considerably after replacement therapy with estradiol. Some fundamental biochemical characteristics: biosynthesis of DNA, RNA and proteins are changed under the influence of estradiol; this pointed to the proliferative effect of this hormone in adrenal glands.

Ключові слова: естрадіол, кора надниркових залоз, оваріектомія, кортикостероїди, АКТГ, пролактин, рецепція, синтез ДНК

438165

AB 36.216