

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

На правах рукопису

КАЛИНСЬКА Людмила Миколаївна

**НЕЙРОЕНДОКРИННІ ФУНКЦІЇ ЕНКЕФАЛІНОВОЇ, КАЛІКРЕЇН-  
КІНІНОВОЇ І АНГІОТЕНЗИНОВОЇ СИСТЕМ В УМОВАХ  
ГІПЕР- ТА ГІПОКОРТИЦИЗМУ**

14.01.14 - ендокринологія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ - 1997

612.43

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00751901 (N)

Дисертація є рукописом

Робота виконана в лабораторії нейрохімії Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України

**Науковий консультант -**

доктор медичних наук, професор Кононенко Владислав Якович

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук Мікоша Олексій Степанович

доктор біологічних наук, професор Богацька Лідія Наумівна

доктор медичних наук, професор Боднар Петро Миколайович

**Провідна установа-**

Вінницький державний медичний університет ім.М.І.Пирогова

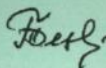
Захист відбудеться "20" травня 1997 р. о 13<sup>00</sup> год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.23.01. в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України (254114 Київ, вул. Вишгородська, 69).

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

Автореферат розісланий "11" квітня 1997 р.

Вчений секретар спеціалізованої

вченої ради доктор медичних наук

 Т.П. Безверха

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність та ступінь дослідженості теми На сучасному етапі розвитку ендокринології - науки про гормональну регуляцію фізіологічних функцій і обміну речовин важливого значення набули питання про механізми взаємодії гормонів з іншими регуляторними системами, зокрема з нервовою системою [В.П.Комисаренко, В.Я.Кононенко, 1980; В.Я.Кононенко і співавт., 1994; G.Fink, 1991; J.Funder, 1987]. Важливим досягненням останніх десятиріч є відкриття і вивчення нейропептидів, які виявилися регуляторами найскладніших функцій ЦНС [И.П.Ашмарин, 1988; Л.А.Громов, 1992; В.Сalvino, 1990]. Утворюючи самостійну, розгалужену систему регуляції функцій організму, нейропептиди беруть участь в контролі нейроендокринної функції, зокрема, кортикотропної функції гіпофізу.

Зараз відомо, що регуляторні ефекти, які раніше приписували дії кортиколіберину (КРФ), в дійсності визначаються сумісною дією декількох факторів, спільний вплив яких посилює наступну гормональну реакцію. Кортикотропін-релізінг активність притаманна ряду пептидів, серед яких важливе місце займають ангіотензини і кініни. Крім того, ці пептиди потенціюють дію КРФ [P.Madeddu, 1992; L.Malendowicz, 1996; K.Muracami, 1987; T.Sumitomo, 1991]. На відміну від ангіотензинів і кінінів, енкефаліни беруть участь в тонічному гальмівному контролі функції гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи (ГНС), знижуючи синтез і секрецію КРФ і АКТГ [J.Buckingham, 1987; A.Grossman, 1989; S.I'Hereault, 1991]. В зв'язку з цим, очевидно, що параметри реакції гіпофізарно-надниркової системи (ГНС) на активуючий чи гальмівний сигнал (стреси, введення гормонів, різні патології) визначаються співвідношенням вивільнених пептидів - КРФ, вазопресину, ангіотензину, кінінів, енкефалінів, та

ЛНБ ім. В. Стефанива  
АН України

інших пептидів, тобто змінами активності кожної з систем, характер і роль яких не з'ясовано. Залишаються також нез'ясованими багато питань, що відносяться до механізмів реалізації пептидергічного контролю функції ГГНС при різних станах організму. Досі не склалося узагальнюючих уявлень про те, чи контролюють ангіотензин II, брадикінін, калікреїн, енкефаліни лише тонічну секрецію АКТГ, чи ці пептиди включаються в регуляцію при станах, що супроводжуються підвищенням або зниженням його секреції. Одним з невивчених є питання про характер та значення змін активності енкефалінової, калікреїн-кінінової та ангіотензинової систем мозку у механізмах контролю регуляторними пептидами секреції КРФ і АКТГ. З цим зв'язано невивчене до цього часу питання про роль нейропептидів гіпоталамусу, гіпофізу і лімбічних структур мозку в регуляції кортикостероїдами секреції КРФ і АКТГ за принципом зворотнього зв'язку. Особливе значення мають також дослідження ролі регуляторних пептидів в патогенезі нейроендокринних захворювань, які розвиваються внаслідок пошкодження центральних механізмів регуляції ГГНС - хвороби Іценка-Кушинга та гіпоталамічних синдромів, клінічна симптоматика яких схожа з цією хворобою.

Особливістю організації і функціонування таких важливих для ЦНС медіаторних пептидів як ангіотензин II, енкефаліни і кініни є багатоетапність біосинтезу і протеолітичного процесінгу пептидів-попередників, процесів розпаду активних пептидів, а також можливість взаємодії гормонів з пептидними системами на різних етапах їх формування і метаболізму. Визнання основної ролі ферментативної регуляції вмісту нейропептидів в різних тканинах і рідинах організму базується на участі протеолітичних ферментів в процесах формування та інактивації пептидів [А.Н.Вернигора, М.Т.Генгин, 1996; О.А.Гомазков, 1992; Л.А.Громов,

1992; B. Calvino, 1990; N. Darby, 1990]. Тому поряд з вивченням вмісту і рецепції регуляторних пептидів при дії гормонів, важливе значення мають дослідження процесів протеолітичного процесінгу та інактивації пептидів, які майже не проводились.

**Мета роботи** - вивчити стан основних нейрохімічних процесів, які забезпечують функціонування енкефалінової, калікреїн-кінінової і ангіотензинової систем в гіпоталамусі, аденогіпофізі і лімбічних структурах мозку щурів при порушенні функції ГНС, а також з'ясувати роль нейропептидів в регуляції гіпофізарно-надниркової системи в умовах експериментального гіпер- і гіпокортицизму, а також у хворих з порушенням функції ГНС.

**Основні завдання роботи:**

1. Дослідити основні нейрохімічні параметри енкефалінергічної опіоїдної системи (ЕОС) - вміст і специфічне рецепторне зв'язування лейцин-енкефаліну, а також активність енкефалін-гідролізуючих ферментів в структурах мозку, аденогіпофізі і крові щурів при змінах гормонального статусу - одно- і двобічній адреналектомії та введенні гідрокортизону і АКГГ інтактним і адреналектомованим щурам.

2. Вивчити вплив синтетичного аналогу лейцин-енкефаліну - даларгіну на основні нейрохімічні параметри ЕОС мозку і гіпофізу, а також на функціональний стан ГНС у щурів в нормі і при експериментальній патології надниркових залоз.

3. Вивчити основні показники активності калікреїн-кінінової системи (ККС) - активність калікреїну і кінінази I та вмісту калікреїногену в різних відділах мозку, гіпофізі і плазмі крові щурів за умов зміни рівня глюкокортикоїдів.

4. Дослідити активність ангіотензинової системи (АС) - вміст імунореактивного ангіотензину II, специфічне рецепторне зв'язування  $^{125}$ I-ангіотензину II, активність ферментів протео-

літичного процесінгу ангіотензину II - ренін-подібного і ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ) в гіпоталамусі, гіпофізі, лімбічних структурах мозку, надниркових залозах і крові при моделюванні різного рівня глюкокортикоїдів у щурів.

5. Вивчити вплив специфічного інгібітору АПФ - каптоприлу на активність ангіотензинової системи в структурах мозку, гіпофізі, надниркових залозах і крові, а також на функціональний стан ГНС у інтактних щурів і щурів з гіпер- і гіпокортицизмом.

6. Вивчити характер взаємодії енкефалінової і ангіотензинової систем мозку і гіпофізу щурів в нормі та при експериментальній патології ГНС.

7. Дослідити активність АПФ в плазмі крові хворих на хворобу Іценка-Кушинга (ХІК), нейроендокринно-обмінну форму (НЕ-ОГС) і вегето-судинну форму гіпоталамічного синдрому (ВСГС) в стані спокою, при застосуванні різних стимулюючих тестів та після курсу лікування центральними блокаторами функції ГНС.

8. Провести проби з каптоприлом для з'ясування патогенетичної ролі ренін-ангіотензинової системи (РАС) при хворобі Іценка-Кушинга з вираженим гіпертензивним синдромом та для обґрунтування доцільності використання препарату при цій патології.

**Наукова новизна** В цій роботі вперше:

- вивчені особливості змін основних нейрохімічних процесів, які забезпечують функціонування ЕОС, ККС і АС в структурах мозку і гіпофізі - синтезу, протеолітичного процесінгу, рецепції та інактивації нейропептидів при порушенні функціонального стану ГНС.

- показана регіональна специфічність змін активності основних нейрохімічних параметрів ЕОС, ККС і АС в мозку щурів в умовах гіпер- і гіпокортицизму.

- встановлено, що зниження активності ангіотензинової системи в структурах мозку, гіпофізі, надниркових залозах і крові після перорального введення інгібітору АПФ - каптоприлу супроводжується гальмуванням активності ГНС у інтактних і адреналектомованих щурів.
- показано, що активація енкефалінергічних опіоїдних механізмів гіпоталамусу і гіпофізу після введення аналогу лей-енкефаліну - даларгіну супроводжується гальмуванням секреції АКГГ у інтактних і адреналектомованих щурів.
- встановлено, що АПФ є одним з важливих ланцюгів в механізмах взаємодії ангіотензинової і енкефалінової систем мозку в нормі і патології ГНС.
- визначена активність АПФ в плазмі крові і тканинах надниркових залоз у хворих з різними формами гіперкортицизму.
- показано, що застосування каптоприлу призводить до зниження артеріального тиску у хворих на хворобу Іценка-Кушинга.
- виявлені відмінності реакції АПФ крові у здорових і хворих на НЕОГС і ВСГС людей при застосуванні різних стимулюючих тестів - фізичного навантаження та введенні інсуліну і фуроземіду.

### Основні наукові положення, які виносяться на захист

1. Основні нейрохімічні процеси, які забезпечують функціонування енкефалінової, калікреїн-кінінової і ангіотензинової систем ( синтез, протеолітичний процесінг, рецепція і інактивація пептидів ) залучаються до механізму дії гормонів ГНС на головний мозок ; зміни різних за локалізацією і функцією пептидних систем неоднотипні і залежать від тривалості дії гормонів та вихідного гормонального фону.
2. В умовах значних змін рівня гормонів ГНС (підвищення і зниження їх вмісту) включається опіоїдний антистресорний механізм шляхом активації енкефалінергічної нейропередачі - по-

силення процесів вивільнення і інактивації лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі і довгастому мозку та процесів транспорту пептиду в кров. Специфічною реакцією ЕОС на дію гормонів є зміна активності системи в аденогіпофізі - підвищення рівня і рецепції лей-енкефаліну в умовах гіперкортицизму та зниження рівня і рецепції пептиду в умовах гіпокортицизму, що є свідченням включення енкефалінергічного контролю в регуляцію кортикотропної функції при цих патологіях.

3. Активація енкефалінергічних опіоїдних механізмів в гіпоталамусі і гіпофізі після периферичного введення синтетичного аналогу лей-енкефаліну - даларгіну шурам супроводжується гальмуванням кортикотропної функції аденогіпофізу в нормі та в умовах гіперсекреції АКТГ після адреналектомії.

4. Зниження активності ангіотензинової і калікреїн-кінінової систем в гіпоталамусі і аденогіпофізі при дії надлишку глюкокортикоїдів є одним з нейроендокринних механізмів гальмування секреції АКТГ. Неоднаковий характер змін - підвищення активності ККС і зниження активності АС мозку і гіпофізу в умовах гіпокортицизму вказує на різну роль цих систем в реакції ГГНС на дію адреналектомії. На відміну від ККС, ангіотензинова система не залучається до механізму активації секреції АКТГ в цих умовах; зниження синтезу і рецепції ангіотензину II носить компенсаторний характер.

5. Зниження рівня ангіотензину II, а також підвищення вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі і аденогіпофізі є основними факторами в механізмі гальмування секреції АКТГ і кортикостероїдів у інтактних і адреналектомованих тварин при дії інгібітору АПФ - каптоприлу.

6. Одним з важливих ланцюгів в механізмах взаємодії ангіотензинової та енкефалінової систем мозку в нормі і при пато-

логії ГГНС є ангіотензин-перетворюючий фермент.

7. В умовах експериментального гіперкортицизму та у первинних хворих на хворобу Іценка-Кушинга базальна активність АПФ крові знижена. Важливу роль в патогенезі кортикостероїдної гіпертензії відіграє тканинний ангіотензин II, утворення і вміст якого підвищується в довгастому мозку і надниркових залозах щурів з гіперкортицизмом та в надниркових залозах хворих з хворобою і синдромом Іценка-Кушинга.

8. Зміни реакції АПФ крові на різні навантажувальні тести та зміни після курсу лікування блокаторами ГГНС у хворих на НЕОГС і ВСГС свідчать, що порушення РАС є одним з патогенетичних факторів розвитку артеріальної гіпертензії у цих хворих.

9. Зміни активності енкефалінової, калікреїн - кінінової і ангіотензинової систем в мозку і гіпофізі є важливими факторами в центральних механізмах регуляції кортикотропної функції при патології ГГНС - гіпер- і гіпокортицизмі.

#### Науково-практичне значення одержаних результатів

Теоретичні положення, які випливають з результатів проведених досліджень, є суттєвим внеском в поглиблення та розвиток проблеми "Механізм дії гормонів", зокрема такої її складової частини як "Гормони і головний мозок". Одержані дані розкривають важливе значення змін основних нейрохімічних процесів, які забезпечують функціонування ЕОС, ККС і АС гіпоталамусу, лімбічних структур мозку і аденогіпофізу, в механізмах дії кортикостероїдів на головний мозок, а також роль цих змін в регуляції нейроендокринних функцій ГГНС в умовах гіпер- і гіпокортицизму.

У хворих з різними формами гіперкортицизму виявлені порушення периферичних ланок РАС - активності АПФ надниркових залоз і крові (базального рівня, реакції на різні навантажувальні тести та зміни після курсу лікування блокаторами ГГНС).

Визначення активності АПФ плазми крові у хворих на ХІК, НЕОГС та ВСГС в стані спокою і при застосуванні різних тестів - введення каптоприлу, інсуліну, фуросеміду може бути використано для оцінки функціонального стану РАС, її ролі в розвитку гіпертензії, а також доцільності використання фармакологічних препаратів в терапії артеріальних гіпертензій.

**Реалізація результатів наукових досліджень** По темі дисертації опубліковано 43 наукові роботи, з них 17 статей в спеціалізованих журналах та збірниках (5 одноосібних і 12 у співавторстві) та інформаційний лист МОЗ України.

**Апробація роботи.** Основні положення дисертації доповідалися та були обговорені на II Всесоюзному з'їзді ендокринологів (Ленінград, 1981), IV Українському біохімічному з'їзді (Дніпропетровськ, 1982), III з'їзді ендокринологів УРСР (Вінниця, 1982), Міжреспубліканській конференції ендокринологів (Каунас, 1982), IX Всесоюзній конференції з біохімії нервової системи (Бреван, 1983), засіданні Київського міського товариства ендокринологів (Київ, 1984), засіданні Київського міського товариства патофізіологів (Київ, 1984), Конференції ендокринологів Прибалтійських республік (Тарту, 1984), III Всесоюзному симпозиумі "Стрес, адаптація та функціональні порушення" (Кишинів, 1984), Міжнародному симпозиумі з нейроендокринології (Ленінград, 1985), Конференції Українського республіканського товариства патофізіологів (Запоріжжя, 1985), V Всесоюзному біохімічному з'їзді (Київ, 1986), V Українському біохімічному з'їзді (Івано-Франківськ, 1987), III Всесоюзній конференції по нейроендокринології (Харків, 1988), Симпозиумі Латвійського наукового товариства ендокринологів (Рига, 1988), II Всесоюзній конференції по нейронаукам (Київ, 1988), IV Всесоюзному з'їзді патофізіологів (Кишинів, 1989), III Всесоюзному з'їзді

ендокринологів (Ташкент, 1989), XIII міжреспубліканській конференції ендокринологів (Таллінн, 1990), II Всеросійському з'їзді ендокринологів (Челябінськ, 1991), Міжнародному конгресі патофізіологів (Москва, 1991), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), Конференції науково-медичного товариства патофізіологів України (Дніпропетровськ, 1992), V з'їзді ендокринологів України (Івано-Франківськ, 1994), IV Всеросійській конференції нейроендокринологів (Санкт-Петербург, 1995).

**Об'єкт та структура роботи.** Дисертація надрукована на 342 сторінках і складається із вступу, огляду літератури (3 глави), глави "Методи та моделі дослідження", 8 глав результатів власних досліджень і їх обговорення, заключення, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури, який налічує 672 джерела. Текст роботи включає 70 таблиць, 4 рисунки і 1 схему.

**Декларація особистого внеску.** Дисертаційна робота виконана самостійно. Дослідження активності реніну в мозку і крові щурів проведено за участю к.м.н. Яковлева А.А; дослідження артеріального тиску у щурів - за участю к.б.н. Рускевича Ю.Б., наукового співробітника Інституту геронтології АМН України. Застосування проб з каптоприлом у хворих на ХІК проведено при консультації д.м.н. проф. Комісаренка І.В.

## **МЕТОДИ ТА МОДЕЛІ ДОСЛІДЖЕННЯ**

### **Об'єкт та постановка експериментальних досліджень**

Досліди проведені на щурах-самцях лінії Вістар масою 170-220 г (біля 3000 щурів). В експериментах *in vivo* використані наступні гормональні, фармакологічні та хімічні препарати: гідрокортизон ("Gedeon Richter", Угорщина)- 50 мг/кг; кортикотропін та суспензія кортикотропін-цинк-фосфату (Каунаський завод ендокринних препаратів)- 25 од/кг маси; синактен депо (В<sup>1-24</sup>кортикотропін) "Ciba" Базель, Швейцарія, 25 од/кг маси;

каптоприл (Captopil фірми "Calenica" або Capoten фірми "Zorka", Югославія) вводили в дозі 10, 25 та 50 мг/кг перорально; даларгін (Д-ала<sup>2</sup>-лей<sup>5</sup>-арг<sup>6</sup>-енкефалін, Кардіологічний центр РАМН) - один із синтетичних аналогів лей-енкефаліна вводили доочередно в дозі 100 мкг/кг маси.

1-2 серії - одноразове введення гідрокортизону чи кортикотропіну інтактним щурам. Декапітацію тварин проводили через 1, 2 та 4 год після ін'єкції гормонів.

3-4 серії - щодобове на протязі 7 діб введення гідрокортизону чи кортикотропін-цинк-фосфату інтактним щурам. Щурів декапітували через 24 год після останньої ін'єкції гормонів.

5 серія - однобічна адреналектомія. Тварин брали у дослід на 3-4 добу після операції.

6 серія - двобічна адреналектомія. Тварин брали у дослід на 7 добу, а також на 10 добу після операції.

7-8 серія - одноразове на 7-му добу після двобічної адреналектомії введення гідрокортизону та кортикотропіну оперованим щурам. Забій тварин проводили через 4 год після ін'єкції препаратів.

9-11 серія - одноразове пероральне введення каптоприлу (10 мг/кг) інтактним щурам, а також щурам після одно- та двобічної адреналектомії. Забій тварин проводили через 2 та через 4 год після введення препарату.

12 серія - щоденне на протязі 7 діб сумісне введення гідрокортизону та каптоприлу інтактним щурам.

13-14 серія - одноразове доочередне введення даларгіну (100 мкг/кг) інтактним та адреналектомованим щурам. Щурів декапітували через 1 та 4 години після введення препарату.

15 серія - щоденне на протязі 7 діб доочередне введення даларгіну (100 мкг/кг маси). Забій тварин проводили через 24

години після останньої ін'єкції препарату.

16 серія - п'ятиразове введення даларгіну на 7, 8 і 9 день після двобічної адреналектомії (починаючи з 7-го дня після двобічної адреналектомії з інтервалом в 12 годин). Щурів декапітували на 10 день після операції і 24 години після введення даларгіну.

Контрольним щурам одно- або багаторазово вводили фізіологічний розчин. Одно- і двобічну адреналектомію проводили під ефірним наркозом. В дослідях з адреналектомованими щурами контролем були несправжньооперовані тварини.

Введення каптоприлу здійснювали за допомогою атравматичного зонду в об'ємі 0,3 - 0,5 мл.

Після декапітації тварин, головний мозок виймали з черепної коробки, промивали охолодженим фізіологічним розчином, звільнювали від мозкових оболонок і кровеносних судин. Після цього виділяли гіпоталамус, гіпокамп, стріатум, довгастий мозок і аденогілофіз. Гіпоталамус розділяли фронтально на передню та медіо-базальну частини розрізом на рівні прикріплення гіпофізарної ніжки. Досліджували також надниркові залози. Наважки тканин гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тефлонним товкачиком Поттера - Ельвейема у середовищі, яке відповідало умовам подальших досліджень. Кров збирали в центрифужні пробірки, які містили 0,1 мл гепарину. Плазму крові отримували центрифугуванням крові при 3-4 тис. об/хв на протязі 20 хв. Всі операції проводили в холодній кімнаті при  $0^{\circ}$ - $4^{\circ}\text{C}$ .

**Об'єкт та постановка клінічних досліджень** Обстежено 109 хворих (19 чоловіків і 90 жінок) на хворобу і синдром Іценка-Кушинга (ХІК і СІК) у віці від 20 до 69 років. Всі хворі проходили обстеження та лікування в хірургічному відділі клініки Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка

(керівник - професор І.В.Комісаренко). Діагноз захворювання був підтверджений результатами клінічних, лабораторних і рентгенологічних досліджень. Порівняльний аналіз активності АПФ в крові і надниркових залозах хворих проводили в залежності від ступеня тяжкості захворювання та методів лікування. По цьому принципу хворі були розділені на 6 груп. До контрольної групи було включено 10 практично здорових донорів в віці від 20 до 45 років. Тканину та пухлини кори надниркових залоз отримували при проведенні операції на надниркових залозах у хворих на хворобу і синдром Іценка-Кушинга (31 пацієнт). Як контроль використовували відносно незмінну непухлинну тканину кори наднирників у хворих з пухлинами наднирників (12 зразків).

З метою оцінки ролі РАС в патогенезі гіпертензивного синдрому при хворобі Іценка-Кушинга та визначення ефективності каптоприлу при лікуванні цих хворих в кожному окремому випадку проводили натще одноразові проби з каптоприлом в дозах 12,5 - 25 мг в залежності від виразності клінічної симптоматики, перорально у 12 хворих. До прийому каптоприлу та через 1 і 2 години після вживання препарату у хворих вимірювали артеріальний тиск (АТ). Проба оцінювалась як позитивна при зниженні систолічного АТ на 30 мм рт.ст. та діастолічного АТ на 15 мм рт.ст. і більше.

При обстеженні хворих на ХІК приймали до уваги ряд клінічних та лабораторних показників, які були одержані при обстеженні пацієнтів в клініці - АТ та екскреція з сечею 17-ОКС.

Обстежено також 30 хворих на нейроендокринно-обмінну форму гіпоталамічного синдрому та 7 хворих на вегето-судинну форму гіпоталамічного синдрому, розвиток захворювання у яких супроводжувався лабільною артеріальною гіпертензією (140/80 - 240/140 мм рт.ст.). Ці хворі проходили обстеження та лікування

в відділенні загальної ендокринної патології ІЕОР (керівник - професор В.А.Олійник). Контрольну групу склали 17 практично здорових чоловік. Активність АПФ досліджували натще та через 30, 60, 120 хв після внутрішньовенного введення інсуліну (0,1 од. на кг маси тіла), фуросеміду (40 мг), а також після дозованого велоергометричного навантаження у субмаксимальній дозі і на 20-й хвилині відновного періоду.

У всіх випадках кров для аналізу брали з ліктьової вени, натще. Одержану після центрифугування плазму крові зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Методи дослідження

**Мембранну фракцію** з різних відділів мозку одержували за методом В.С.Горенштейна та С.Г.Снайдера [1980] у модифікації Н.А.Бєляєва [1983]. **Фракцію синаптичних мембран** з різних відділів мозку одержували за методом В.В.Рожанец [1983]. **Мікросомальну фракцію** одержували центрифугуванням постмітохондріальної надосадової рідини при 105000 g на протязі 60 хв.

**Вміст ангіотеназину II** в екстрактах мозку і гіпофізу визначали радіоімунологічним методом з використанням стандартних наборів фірми "Buhlmann" (Швейцарія). **Активність ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ)** в структурах мозку і гіпофізу досліджували за допомогою флуоресцентного методу, описаного для мозку Н. Yang і N. Neff [1972], використовуючи як субстрат гіпурил-гистидил-лейцин. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі "Hitachi" "MPF-2A". **Активність АПФ в плазмі крові** людей і тварин визначали за методом Л.В.Павліхної [1975]. **Ренін-подібну активність** екстрактів мозку визначали радіоімунологічним методом з використанням стандартних наборів фірми "Cea-Jre-Sorin" (Франція). **Активність кислій протеїнази (катепсину D)** визначали за методом M. Anson [1958]. За-

гальну активність кислій протеїнази визначали в лізосомній фракції чи в гомогенаті тканини мозку після попередньої інкубації (30 хв,  $4^{\circ}\text{C}$ ) з тритоном X-100 в кінцевій концентрації 0,1 %. Вільну, зв'язану і неседиментовану активність ферменту визначали за методом, який був описаний А.А.Покровским і В.А.Тутельяном [1976]. **Величину специфічного зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ангіотензину II** з рецепторами в препаратах мембранної фракції гіпоталамусу і гіпофізу визначали як різницю в зв'язуванні мітки у відсутності (дослідна проба) і в присутності (контрольна проба) в реакційній суміші надлишку неміченого ліганду. Розділення зв'язаного і вільного ангіотензину II здійснювали центрифугуванням проб при 13000 g 10 хв в закритих пробірках. Радіоактивність вимірювали в гама лічильнику Beckman - 5500. **Вміст лейцин-енкефаліну** визначали методом радіоімунного аналізу за допомогою наборів фірми "Incstar" (США) після екстракції опіодних пептидів з тканини мозку 0,1 М розчином оцтової кислоти [В.А.Жила, Л.А.Громов, 1984]. **Активність енкефалінгідролізуючих ферментів** - амінопептидази, енкефалінази А, енкефалінази В, а також пептидилдипептидази, які каталізують розщеплення різних зв'язків в молекулі лей-енкефаліну, визначали за радіоактивністю продуктів ферментативної деградації  $^3\text{H}$ -лей-енкефаліну (1,81 ТБк/ммоль, фірми "Amersham", Англія) [В.Gorenstein, S.Snyder, 1980]. Тонкошарову хроматографію продуктів реакції проводили на пластинках "Silufol UV 254" (ЧССР). Після хроматографії вирізали зони, які відповідають положенню маркерів, і вимірювали їх радіоактивність. **Величину специфічного зв'язування  $^3\text{H}$ -лейцин-енкефаліну** (1,81 ТБк/ммоль, фірми "Amersham", Англія) з опіатними рецепторами у препаратах синаптичних мембран мозку визначали як різницю зв'язування мітки у відсутності (дослідна проба) й присутності (контрольна

проба) в реакційній суміші надлишку неміченого ліганду. Розділення зв'язаного і вільного енкефаліну проводили методом вакуумного фільтрування через фільтри "Sinpor" (Чехія). **Активність калікреїну та вміст калікреїногену** визначали в одержаній на ДЕАЕ-сефадексі А-50 неадсорбованій фракції мозку і гіпофізу, яка містить білки калікреїну і калікреїногену, що не сорбуються на сефадексі, за допомогою спектрофотометричного методу по швидкості гідролізу етилового ефіру N-бензоїл-аргініну (BAEE) [Т.С.Пасхіна, А.В.Кринська, 1974]. **Активність кінінази I в мозку і гіпофізі щурів** визначали спектрофотометричним методом J.Folk [1960] в модифікації Т.С.Пасхіної [1970], використовуючи як субстрат гіпурил-L-лізин. Кількість гіпурової кислоти, одержаної в результаті реакції, визначали за зміною оптичної густини проби при 254 нм проти  $5 \cdot 10^{-4}$  М розчину гіпурил-L-лізину.

**Рівень АКГП** у плазмі крові встановлювали за допомогою комерційних радіоімунних наборів фірми "Amersham" (Великобританія) та "CIS" (Франція). **Вміст 11-ОКС** у плазмі крові щурів визначали за допомогою флюорометричного мікрометоду [Ю.Г.Балашов, 1990] і виражали у нмоль на 1 л. **Вміст білку** у гомогенатах і субклітинних фракціях визначали за методом Lowry [1951] після попередньої екстракції ліпідів органічними розчинниками.

**Регстрування артеріального тиску** в хвостовій артерії щурів здійснювали на електроенцефалографі 8 EG-212. Артеріальний тиск вимірювали до введення гормону, через 15, 30 хв, 1, 2 і 4 год після одноразового, а також через 24 год після останньої ін'єкції при багаторазовому на протязі 7 днів введенні гідрокортизону. **Статистична обробка** даних проведена за Стьюдентом [М.А.Ойвин, 1964]. Статистично значущою вважали відмінність при  $P_t < 0,05$ . При  $0,1 > P_t > 0,05$  проводили додаткову статистичну

обробку даних із застосуванням непараметричного критерію Віл-коксона-Манна-Уїтні. Статистично значущими в цьому випадку вважали відмінність при  $P_u < 0,05$ . Оцінювання статистичного зв'язку показників, що вивчалися, проводили за допомогою рангової кореляції Спірмента ( $\rho$ ); при порівнянні коефіцієнта кореляції використовували метод, який заснований на перетворенні Фішера [Е.В.Гублер и др., 1973].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Енкефалінергічна система мозку і гіпофізу за умов змін рівня кортикостероїдів в організмі

Представлені в роботі експериментальні дані впливу гіпері гіпокортицизму на основні нейрохімічні параметри енкефалінергічної системи - вміст лей-енкефаліну, специфічне рецепторне зв'язування  $^3\text{H}$ -лей-енкефаліну та активність енкефалінгідролізуючих ферментів в мозку і гіпофізі свідчать про значні зміни в системах вивільнення, синтезу, рецепції і інактивації.

Згідно з нашими даними, зниження вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі і довгастому мозку після одно- і багаторазового введення гідрокортизону і АКГ (табл.1) відбувається одночасно зі зниженням рецепторного зв'язування  $^3\text{H}$ -лей-енкефаліну та підвищенням активності енкефалінгідролізуючих ферментів. Виявлене в наших дослідженнях зниження специфічного зв'язування міченого лейцин-енкефаліну, очевидно, відбувається за відомим механізмом ауторегуляції опіатних рецепторів, який полягає в адаптивному зниженні кількості рецепторів на мембранах клітин-мішеней у відповідь на підвищення надходження до них вивільнених ендогенних енкефалінів [R.Simantov, 1982]. Зниження рецепторного зв'язування  $^3\text{H}$ -лей-енкефаліну і  $^3\text{H}$ -D-Ala, D-Leu-енкефаліну використовується як критерій оцінки вивільнення ендогенних енкефалінів з депо [Н.А.Беляев, 1984].

Таблиця 1

Вміст лейцин-енкефаліну в різних структурах мозку, гіпофізі (пмоль/мг тканини) і крові (пмоль/мл) щурів після одно- і багаторазового введення гідрокортизону і АКГТ ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Об'єкт дослідження	Контроль	Гідрокортизон	АКГТ
--------------------	----------	---------------	------

## Одноразове введення ( 1 година )

Гіпоталамус	$0,345 \pm 0,030$	$0,230 \pm 0,028^*$	$0,192 \pm 0,021^*$
-------------	-------------------	---------------------	---------------------

## Одноразове введення ( 4 години )

Гіпоталамус	$0,316 \pm 0,019$	$0,302 \pm 0,055$	$0,220 \pm 0,033^*$
-------------	-------------------	-------------------	---------------------

Стріатум	$1,017 \pm 0,054$	$0,830 \pm 0,030^*$	$0,800 \pm 0,065^*$
----------	-------------------	---------------------	---------------------

Довгастий мозок	$0,323 \pm 0,019$	$0,366 \pm 0,014$	$0,343 \pm 0,005$
-----------------	-------------------	-------------------	-------------------

Аденогіпофіз	$0,413 \pm 0,079$	$0,453 \pm 0,069$	$0,529 \pm 0,109$
--------------	-------------------	-------------------	-------------------

Плазма крові	$2,02 \pm 0,35$	$3,36 \pm 0,22^*$	$2,56 \pm 0,26$
--------------	-----------------	-------------------	-----------------

## Багаторазове введення ( 7 днів )

Гіпоталамус	$0,674 \pm 0,101$	$0,378 \pm 0,031^*$	$0,327 \pm 0,066^*$
-------------	-------------------	---------------------	---------------------

Стріатум	$0,793 \pm 0,073$	$0,426 \pm 0,015^*$	$0,476 \pm 0,040^*$
----------	-------------------	---------------------	---------------------

Довгастий мозок	$0,364 \pm 0,011$	$0,300 \pm 0,008^*$	$0,318 \pm 0,037$
-----------------	-------------------	---------------------	-------------------

Аденогіпофіз	$0,292 \pm 0,027$	$0,421 \pm 0,036^*$	$0,458 \pm 0,080^*$
--------------	-------------------	---------------------	---------------------

Плазма крові	$1,82 \pm 0,37$	$3,31 \pm 0,27^*$	$2,66 \pm 0,50$
--------------	-----------------	-------------------	-----------------

\* -  $P < 0,001 - 0,05$

На підставі цих даних можна зробити висновок, що в умовах підвищення рівня глюкокортикоїдів відбувається прискорення вивільнення лей-енкефаліну з їх ендогенних депо - секреторних везикул пептидергічних нейронів гіпоталамусу, стріатуму та довгастого мозку, зв'язування пептиду з опіатними рецепторами, кількість яких внаслідок негативної регуляції знижується і, відповідно, до активації енкефалінгідролізуючих ферментів, що спостерігається через 4 год після одноразового та після багаторазового введення гідрокортизону і АКГ. Зниженням кількості зв'язуючих місць на мембранах клітин мозку у відповідь на тривалу зайнятість опіатних рецепторів ендогенними енкефалінами, очевидно, можна пояснити послаблення фармакологічних ефектів морфіну і екзогенних опіатів та підвищення добровільного споживання морфіну після введення шурам дексаметазону, що було показано рядом дослідників [B.Kasson, 1983; S.Sun et al., 1996].

Виявлене на 7-ий день після адrenaлектомії зниження вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та аденогіпофізі відбувається поряд зі зниженням активності енкефалінамінопептидази і відсутністю змін активності енкефалінази А і В в мозку і гіпофізі шурів. Одночасно з цим, відбувається зниження рецепторного зв'язування міченого лей-енкефаліну в структурах мозку і аденогіпофізі. Враховуючи це, зниження вмісту пептиду в гіпоталамусі, стріатумі та аденогіпофізі шурів на цей період після видалення надниркових залоз, очевидно, обумовлене посиленням вивільненням лей-енкефаліну з нейросекреторних гранул з його наступною дією на більш чи менш віддалені рецептори. Введення адrenaлектомованим тваринам гідрокортизону і АКГ призводить до часткової нормалізації рецепції енкефалінів і активності енкефаліназ, що свідчить про здатність глюкокортикоїдів регулювати процеси вивільнення і метаболізму енкефалінів.

Про вплив кортикостероїдів на системи вивільнення енкефалінів свідчить також регіональна і тканинна специфічність змін активності ЕОС. Після введення гідрокортизону і АКГ одночасно зі зниженням вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі і довгастому мозку - в аденогіпофізі і крові спостерігається підвищення рівня пептиду (табл.1). В аденогіпофізі спостерігається також підвищення рецепторного зв'язування міченого лей-енкефаліну. Підвищення вмісту і рецепції лей-енкефаліну в цих умовах може бути пов'язано з активацією гормонами процесів синтезу гіпофізарного пептиду і його рецепторів, а також процесів акумулювання пептиду в аденогіпофізі. Враховуючи, що синтезовані в передньому гіпоталамусі нейропептиди надходять в серединне підвищення, а потім транспортуються через кровеносні судини ворітної системи в аденогіпофіз, подібні зміни можуть бути частково пов'язані з активацією процесів транспорту енкефалінів в гіпофіз і вивільненням їх в системну циркуляцію.

На відміну від гіперкортицизму, в умовах гіпокортицизму зниження рівня лей-енкефаліну спостерігається як в структурах мозку, так і в аденогіпофізі; при цьому в крові встановлено підвищення рівня пептиду. Це дозволяє припустити, що частина вивільненого з нейросекреторних гранул мозку і гіпофізу пептиду надходить в системну циркуляцію. Можливо, як у випадку з іншими нейропептидами, вихід енкефалінів в різні клітини мозку і кров синергічний і тому по рівню нейропептиду в крові можна говорити про активність енкефалінергічної передачі і нейромодуляції в мозку [Л.А.Громов, 1992].

Важливим моментом в реакції ЕОС на зміни рівня кортикостероїдів є виявлена нами залежність характеру змін енкефалінів від тривалості дії гормонів. Зміни активності системи, які виникають після одноразового введення гормонів носять фазний ха-

ракти. Зниження вмісту лей-енкефаліну і активності енкефалін-гідролізуючих ферментів в гіпоталамусі і інших відділах мозку через 1 год після введення гідрокортизону і АКТГ та відновлення вмісту лей-енкефаліну і підвищення активності енкефалінгідролізуючих ферментів через 4 год дії цих гормону відбивають різні фази реакції ЕОС на введення гормонів. Очевидно, що після індукованого одноразовим введенням гормонів вивільнення енкефаліну відбувається активація синтезу нейропептиду і ферментів його метаболізму. Після тривалого, на протязі 7 днів введення гідрокортизону і АКТГ (через 24 год після останньої ін'єкції) відмічено більш виразне зниження рівня лей-енкефаліну в структурах мозку в порівнянні з одноразовим. Очевидно, за цих умов, процеси вивільнення лей-енкефаліну і розщеплення їх енкефаліназами превалюють над процесами біосинтезу пептиду, що призводить до істотного зниження рівня пептиду в відділах мозку. При дослідженні ЕОС в умовах гіпокортицизму показано, що після односторонньої адrenaлектомії вміст лей-енкефаліну знижується тільки в медіо-базальному гіпоталамусі. Після двобічної адrenaлектомії зміни рівня нейропептиду носять двофазний характер: зниження вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та аденогіпофізі на 7-ий день та підвищення його вмісту до нормального рівня на 10-ий день після операції. Останнє, очевидно, є наслідком як адаптивного підвищення синтезу пептиду, так і встановленого нами на цей період зниження активності енкефалінамінопептидази в мозку і гіпофізі шурів.

За даними літератури, вміст іншого опіоїдного пептиду - мет-енкефаліну знижується в гіпоталамусі шурів через 24 год після адrenaлектомії і залишається зниженим не менше 6-ти днів. Відновлення рівня мет-енкефаліну в гіпоталамусі спостерігалось через 11 і 18 днів після операції [A.Gibson, 1980].

Таким чином, згідно з результатами наших досліджень і даними літератури, характерним для динаміки змін рівня енкефалінів після адrenaлектомії, введення глюкокортикоїдів і стресу [Р.Тигранян, 1987; Y.Yamamoto, 1996] є те, що після посилення вивільнення енкефалінів з ендогених депо настає компенсаторне підвищення синтезу цих пептидів в структурах мозку. З літератури, яка в більшості присвячена вивченню впливу різних стресів на ЕОС, випливає, що реактивація ЕОС може відбуватися шляхом переходу енкефалінів з резервного пулу за рахунок активації матричного синтезу проенкефалінової мРНК, а також реактивації енкефалінутворючих пептидаз [О.А.Гомазков, 1989, L.Lightman, 1987]. Тривалість цих стадій залежить від характеру стресорної дії.

Важливим моментом в дії регуляторних пептидів, зокрема, енкефалінів, є їх здатність індукувати чи гальмувати вихід інших нейропептидів [И.П.Ашмарин, 1988]. Беручи до уваги існуючі уявлення про участь енкефалінів в інгібуванні тоничної секреції АКГР [A.Grossman, 1989, S.I'Heneault, 1991], можна припустити, що в умовах надлишку чи нестачі кортикостероїдів в організмі ефекти опіоїдів на ГНС можуть істотно модулюватись, включаючись в регуляцію активності цієї системи за принципом зворотнього зв'язку. Згідно з одержаними даними, підвищення активності ЕОС в аденогіпофізі в умовах тривалої дії надлишку кортикостероїдів може бути одним з факторів гальмування секреції АКГР в цих умовах. Одним з механізмів підвищення секреції КРФ і АКГР після адrenaлектомії, за нашими даними, може бути зниження рівня, а отже і інгібіторної дії лей-енкефаліну в гіпоталамусі, гіпофізі та в структурах мозку, які містять закінчення пептидергічних нейронів. Нормалізація рівня лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та гіпофізі на 10-ий день після

адреналектомії може істотно обмежувати подальше посилення секреції АКТГ, рівень якого на цей період досягає плато [J.Weidenfeld, 1984]. Ці результати, а також дані про нормалізуючий вплив гідрокортизону і АКТГ на вміст і рецепцію лей-енкефаліну в аденогіпофізі, гіпоталамусі і стріатумі адреналектомованих тварин також свідчать про те, що опіоїди є однією з стреслімітуючих систем і виконують компенсаторні функції при виникненні екстремальних ситуацій. Разом з тим, важливо підкреслити, що після тривалого введення гідрокортизону і АКТГ, на відміну від одноразового, не спостерігається нормалізація рівня лей-енкефаліну в структурах мозку. Значне зниження концентрації лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі і довгастому мозку і підвищення його рівня в аденогіпофізі і крові може бути важливим фактором порушення функціональної стабільності нервової системи в умовах тривалої дії кортикостероїдів.

#### Зміни активності лей-енкефалінової системи мозку та функціонального стану ГНС щурів під впливом даларгіну

Виявлені в наших дослідженнях зміни активності ЕОС, характер яких в центрах регуляції ГНС залежить від рівня глюкокортикоїдів, свідчить про включення цієї системи в механізми регуляції ГНС при дії активуючих і гальмівних сигналів. Ці висновки знайшли своє підтвердження при використанні структурного аналогу енкефаліну - даларгіну, який є агоністом  $\delta$ -опіатних рецепторів. Реакцію ЕОС на доочервне введення даларгіну досліджували в структурах мозку, зв'язаних з регуляцією ГНС.

Показано, що одно- і багаторазове введення даларгіну інтактним щурам призводить до зниження специфічного зв'язування <sup>3</sup>Hлей-енкефаліну з рецепторами, а також до зниження вмісту лей-енкефаліну і підвищення активності енкефалінази А в гіпоталамусі, що, очевидно, є наслідком саморегулюючих відносин в ЕОС

у відповідь на підвищення рівня екзогенного опіоїдного пептиду - даларгіну в гіпоталамусі.

В аденогіпофізі після введення даларгіну зниження вмісту лей-енкефаліну не відмічено; відбувається навіть підвищення його рівня, що разом з підвищенням рецепторного зв'язування і активності енкефаліназ свідчить про активацію ендогенної ЕОС аденогіпофізу, процесів її метаболізму. Підвищення вмісту лей-енкефаліну в аденогіпофізі може бути пов'язано з активацією процесів транспорту лей-енкефаліну з гіпоталамусу в аденогіпофіз та процесів акумуляції пептиду в залозі.

Введення даларгіну адреналектомованим щурам також призводить до підвищення рівня ендогенного лей-енкефаліну і активності енкефалінамінопептидази в аденогіпофізі; в гіпоталамусі цих тварин відмічена нормалізація знижених після адреналектомії активності енкефалінамінопептидази і величини специфічного зв'язування  $^3\text{H}$ -лей-енкефаліну.

Враховуючи можливість взаємодії периферично введеного даларгіну з опіоїдними системами в центрах регуляції ГНС - гіпоталамусі і аденогіпофізі, цікаво було дослідити характер впливу препарату на активність ГНС. Встановлено, що даларгін пригнічує активність цієї системи у інтактних і адреналектомованих щурів. Після одно- і багаторазового на протязі 7 днів введення даларгіну інтактним тваринам спостерігається зниження рівня 11-ОКС і одночасне зниження АКГ в плазмі крові. Багаторазове введення даларгіну адреналектомованим щурам призводить до зниження рівня АКГ, підвищеного після операції. Рівень 11-ОКС, знижений в плазмі адреналектомованих щурів, при дії даларгіну не змінюється. Однотипний характер змін кортикостероїдів та АКГ після введення даларгіну інтактним щурам та зниження рівня АКГ при введенні препарату адреналектомованим

тваринам, свідчить про те, що гальмівний ефект даларгіну на секрецію гормонів реалізується шляхом взаємодії препарату з центральними енкефалінергічними системами гіпофізу і гіпоталамусу. Підвищення рівня екзогенного енкефаліну в гіпоталамусі, а також підвищення вмісту і рецепції енкефаліну в аденогіпофізі, а отже інгібіторної дії енкефалінів на кортикотропну функцію гіпофізу після введення даларгіну, очевидно, є одним з важливих чинників в механізмі зниження секреції АКТГ і кортикостероїдів у інтактних і адреналектомованих тварин при дії препарату.

З літератури відомо, що опіоїдні нейропептиди, зокрема даларгін, здатні обмежувати активацію ГНС при екстремальних станах, що було показано на різних моделях стресу (гострій ішемії міокарду, стискуванні м'яких тканин, імобілізації) [Ю.Б.Липманов, В.Д.Слепушкин, В.Н.Ельський, 1985; В.Д.Слепушкин, В.А.Виноградов, М.И.Титов., 1989]. Одержані нами дані свідчать про можливість гальмівного впливу периферично введеного даларгіну на секрецію АКТГ, підвищену в умовах експериментальної патології ГНС - адреналектомії.

**Активність калікреїн-кінінової системи мозку і гіпофізу щурів в умовах гіпер- і гіпокортицизму** При дослідженні ККС показана можливість регуляторної дії кортикостероїдів на різні компоненти системи: в умовах гіпер- і гіпокортицизму змінюється активність ферментів, які приймають участь в протеолітичному процесінгу (калікреїн і калікреїноген) та інактивації брадикініну (кініназа I). Зміни активності калікреїну, кінінази I та рівня калікреїногену в умовах надлишку глюкокортикоїдів мають регіональну та тканинну специфічність і залежать від тривалентності дії гормонів. Більш виразні зміни калікреїнів в мозку щурів встановлені після багаторазового введення гідрокортизону

і АКГГ. За результатами порівняння контрольних і піддослідних груп тварин можна говорити про зниження активності ККС в передньому, медіо-базальному гіпоталамусі і довгастому мозку шурів з гіперкортицизмом. В цих відділах мозку встановлено зниження кінінутворюючої активності, тобто, активності калікреїну (табл.2) і вмісту калікреїногену, а також підвищення активності кінінази I, що свідчить про зниження рівня вільних кінінів. Активність калікреїну і вміст калікреїногену в гіпокампі і стріатумі в умовах гіперкортицизму істотно не змінюється, однак, в цих структурах мозку після одноразового введення гідрокортизону відмічено підвищення активності кінінази I, що, напевно, також свідчить про зниження рівня вільних кінінів. Активність ККС аденогіпофізу шурів в умовах експериментального гіперкортицизму підвищується: підвищується кінінутворююча активність (активність калікреїну і вмісту калікреїногену) і знижується активність кінінази I.

Таблиця 2

Активність калікреїну в мозку і гіпофізі шурів після введення гідрокортизону і АКГГ (  $M \pm m$ , мОд/мг білка,  $n = 6$  )

Об'єкт дослідження	Контроль	Гідрокортизон 7 днів	АКГГ 7 днів
Передній гіпоталамус	781,9 $\pm$ 79,3	539,5 $\pm$ 60,0*	521,9 $\pm$ 42,1*
Медіо-базальний гіпоталамус	688,2 $\pm$ 44,0	538,3 $\pm$ 17,8*	661,3 $\pm$ 49,7
Гіпокамп	344,8 $\pm$ 46,4	280,6 $\pm$ 15,9	319,5 $\pm$ 21,3
Довгастий мозок	558,9 $\pm$ 38,3	420,4 $\pm$ 32,2*	425,5 $\pm$ 40,6*
Аденогіпофіз	1189,6 $\pm$ 91,9	1981,5 $\pm$ 252,3*	1897,3 $\pm$ 166,1*

\* -  $P < 0,001 - 0,05$

Двобічне видалення надниркових залоз у щурів супроводжується підвищенням активності калікреїну, вмісту калікреїногену, а також зниженням активності кінінази I в усіх досліджуваних відділах мозку - гіпоталамусі, гіпокампі, стріатумі, довгастому мозку і аденогіпофізі. Подібні зміни стану ККС розглядають як активацію системи з збільшенням вмісту попередника калікреїну - калікреїногену [О.А.Гомазков, Н.В.Комиссарова, 1982]. Очевидно, в умовах адреналектомії відбувається активація утворення калікреїну з попередника - калікреїногену і одночасно з цим - стимуляція ресинтезу калікреїногену, що призводить до прискорення процесу утворення брадикініну. Одночасно з цим, відбувається гальмування процесу інактивації брадикініну, що каталізується кініназою I. Беручи до уваги дані літератури щодо стимуляції кінінами вивільнення АКГТ з гіпофізу [P.Madeddu, 1990; T.Okajama, 1986], підвищення активності ККС в структурах гіпоталамусу і аденогіпофізі може бути одним з чинників в механізмі активації секреції АКГТ і КРФ, що спостерігається у щурів після адреналектомії.

Одноразове введення гідрокортизону адреналектомованим щурам призводить до нормалізації активності калікреїну, кінінази I і вмісту калікреїногену в гіпокампі, стріатумі, довгастому мозку і аденогіпофізі.

Виразна гетерогенність регуляції активності калікреїнів кортикостероїдами в різних структурах мозку, гіпоталамусі і гіпофізі в умовах надлишку цих гормонів в організмі, очевидно, пов'язана з тим, що калікреїни можуть залучатись в регуляцію функцій, специфічних для тієї чи іншої структури мозку. На підставі фізіологічних і фармакологічних досліджень ефектів калікреїнів і кінінів та характеру розподілення їх в мозку, дослідники прийшли до висновку, що калікреїни в структурах гі-

поталамусу і гіпофізу виконують подвійну функцію - як кініногенази, які утворюють кініни, а також як безпосередні учасники процесінгу інших біологічно активних пептидів, зокрема КРФ в гіпоталамусі [J.Chao et. al., 1987; J.Clements, 1989] та пролактину і проопіомеланокортину в гіпофізі [C.Powers, 1986; D.Pritchett, 1987].

Враховуючи дані про потенціювання кінінами мозку ефекту КРФ [P.Madettu, 1992; T.Okajama, 1986], а також припущення про участь калікреїнів ядер гіпоталамусу в процесінгу цього гормону, зниження активності калікреїну і вмісту калікреїногену в гіпоталамусі в умовах гіперкортицизму, може бути одним з факторів гальмування секреції КРФ, що спостерігається при дії надлишку гідрокортизону і АКТГ. Отже, наші дані свідчать про можливість гальмівної дії ККС на секрецію АКТГ в умовах гіперкортицизму на рівні гіпоталамусу і лімбічних структур мозку за рахунок зниження стимулюючої дії КРФ на аденогіпофіз. Що стосується ККС аденогіпофізу, то в умовах гіперкортицизму встановлено підвищення активності калікреїну і вмісту калікреїногену. Можливо, така реакція калікреїнів аденогіпофізу при одно- і багаторазовому введенні гідрокортизону і АКТГ є компенсаторною і спрямована на збереження певного рівня функціонування кортикотрофів в цих умовах.

Таким чином, одержані дані дають підставу зробити висновок, що зміни активності калікреїну в гіпоталамусі, лімбічних структурах мозку і аденогіпофізі щурів в умовах гіпо- і гіперкортицизму є одним з факторів регуляції секреції АКТГ при цих ендокринних патологіях. Регуляція може здійснюватись чи шляхом утворення кінінів чи опосередковано через утворення інших нейропептидів, зокрема, КРФ в гіпоталамусі та проопіомеланокортину в гіпофізі.

Активність центральної і периферичної ангіотензинової системи за умов змін функціонального стану ГГНС

Порушення функції ГГНС за умов експерименту викликають зміни активності і рівня основних компонентів ангіотензинової системи - вмісту ангіотензину II, активності ферментів протеолітичного процесінгу ангіотензину II - ренін-подібного ферменту і АПФ та специфічного рецепторного зв'язування ангіотензину II в мозку і гіпофізі, а також зміни активності АПФ в надниркових залозах і крові шурів. Дослідження ангіотензинової системи в умовах гіперкортицизму показали, що ефект гідрокортизону і АКГТ залежить від тривалості дії гормонів. Необхідно відмітити двофазність реакції ангіотензинової системи після одноразового введення гідрокортизону і АКГТ. Виявлене через 1 год після введення гормонів короточасне зниження активності ренін-подібного ферменту і АПФ в структурах мозку шурів змінюється через 4 год підвищенням активності ферментів. В гіпоталамусі і аденогіпофізі активність АПФ залишається зниженою. Ефект багаторазового введення гідрокортизону і АКГТ на компоненти ангіотензинової системи подібний до виявленого через 4 год після одноразового введення гормонів, але виразність змін залежить від тривалості їх дії.

Дослідження центральної і периферичної ангіотензинової системи виявили істотні відмінності в дії глюкокортикоїдів на рівні різних структур мозку, гіпофізу, надниркових залоз і крові. Через 4 год після одноразового та після багаторазового введення гідрокортизону в передньому і медіо-базальному гіпоталамусі та аденогіпофізі встановлено зниження активності АПФ, вмісту ангіотензину II (табл.3) і рецепції пептиду, що свідчить про зниження активності ангіотензинової системи. Зниження активності АПФ відмічено також в гіпокампі і плазмі крові. На

Таблиця 3

Вміст ангіотензину II в різних структурах мозку щурів після введення гідрокортизону ( $M \pm m$ , фмоль/г тканини,  $n = 6$ )

Об'єкт дослідження	Контроль	Гідрокортизон 4 год
--------------------	----------	---------------------

Передній гіпоталамус	560,1 $\pm$ 58,0	296,4 $\pm$ 54,2*
Медіо-базальний гіпоталамус	726,6 $\pm$ 108,2	465,7 $\pm$ 79,3*
Довгастий мозок	296,4 $\pm$ 19,9	407,5 $\pm$ 43,2*
Аденогіпофіз	1353,7 $\pm$ 127,8	902,5 $\pm$ 158,5*

\* -  $P < 0,001 - 0,05$

відміну від цього, в стріатумі, довгастому мозку і надниркових залозах виявлено підвищення активності АПФ, а також вмісту ангіотензину II в структурах мозку, що вказує на підвищення активності системи. Важливо, що механізми негативного зворотнього зв'язку в ангіотензиновій системі при цьому не порушуються. В умовах короткочасного і тривалого підвищення рівня кортикостероїдів в гіпоталамусі і гіпокампі відмічено компенсаторне підвищення активності ренін-подібного ферменту, а в стріатумі і довгастому мозку, навпаки, зниження ферментативної активності. Характер змін активності катепсину Д - ферменту, який, за даними літератури [V.Dzau, 1982, 1987], також бере участь в синтезі ангіотензину I в мозку щурів, відрізняється від змін активності ренін-подібного ферменту при дії гормонів.

Введення АКГ викликає подібні до дії гідрокортизону зміни активності ангіотензинової системи в гіпоталамусі, гіпофізі і стріатумі; в довгастому мозку і плазмі крові, на відміну від гідрокортизону, встановлені незначні зміни.

Неоднотипний характер змін компонентів ангіотензинової системи в різних структурах мозку, аденогіпофізі, надниркових залозах і крові в умовах ендо- і екзогенного гіперкортицизму, а також при дії різних стресів, що встановлено, зокрема, О.А.Гомазковим і співавт.[1988, 1992], очевидно, відбиває специфіку клітинно-тканинної організації і регуляції цієї системи. Зниження активності АПФ, вмісту і рецепції ангіотензину II в центрах регуляції ГГНС - гіпоталамусі і аденогіпофізі в умовах гіперкортицизму свідчить про зниження стимуляції цих структур ангіотензином II і включення нейропептиду в механізми гальмування секреції АКТГ і КРФ, що спостерігається при дії надлишку глюкокортикоїдів.

Дослідженнями РАС крові, яка бере участь в системі довгострокової регуляції артеріального тиску (АТ), встановлено зниження активності АПФ після введення гідрокортизону і АКТГ. Отже, підвищення середнього АТ, яке виявлено в наших дослідках після одно- і багаторазового введення гідрокортизону, не пов'язано з підвищенням активності РАС крові. На нашу думку, одним з важливих факторів зростання АТ у щурів з гіперкортицизмом, може бути підвищення активності ангіотензинової системи в довгастому мозку - регіоні, де локалізовано місце центральної пресорної дії ангіотензину II [F.Consolimcolombo, 1996], та зниження в передньому гіпоталамусі - місці, де локалізуються депресорні зони [M.Nathan, 1975]. Одним з важливих чинників зростання АТ у щурів при дії надлишку кортикостероїдів може бути також активація АПФ і утворення ангіотензину II в надниркових залозах, враховуючи, що основною функцією локально продукованого в надниркових залозах ангіотензину II є регуляція синтезу альдостерону [P.Mulrow, 1989; I.Kifor, 1991].

На відміну від гіперкортицизму, в умовах експерименталь-

ного гіпокортицизму зміни активності компонентів АС однотипні: у всіх досліджуваних структурах мозку, гіпофізі і крові встановлено зниження активності АПФ, вмісту ангіотензину II і зниження рецепторного зв'язування міченого ангіотензину II в гіпоталамусі. Ці зміни супроводжуються підвищенням активності ренін-подібного ферменту в структурах мозку, гіпофізі і крові. Зниження загальної активності АПФ виявлено в надниркових залозах шурів після фармакологічної адреналектомії. З літератури відомо про зміни інших компонентів РАС після адреналектомії - через 7 і 14 днів після операції встановлено зниження рівня ангіотензиногену в структурах мозку, СМР і крові [P.Schelling, 1983, C.Wallis, M.Printz, 1980]. Отже, одержані результати і дані літератури свідчать, що в умовах гіпокортицизму має місце зниження центральної і периферичної ангіотензинової системи - в різних структурах мозку, аденогіпофізі, крові і надниркових залозах. При цьому знижується активність різних компонентів цієї системи - рівня ангіотензиногену, активності реніну, АПФ, вмісту і рецепторного зв'язування ангіотензину II.

Зниження процесів утворення ангіотензину II, вмісту і рецепції пептиду в структурах, які безпосередньо зв'язані з регуляцією ГГНС - в гіпоталамусі, лімбічних структурах мозку і гіпофізі шурів в умовах гіпокортицизму свідчить, що ангіотензин II не залучається до механізмів активації синтезу і секреції АКТГ, що спостерігається після адреналектомії. Очевидно, в цих умовах інші фактори, такі як КРФ, вазопресин [G.Makara, 1986], а також кініни, енкефаліни, тощо, включаються в стимуляцію секреції АКТГ. Порівнюючи характер змін ангіотензинової системи в умовах надлишку і нестачі глюкокортикоїдів в організмі, можна прийти до висновку про незалежність механізмів, що регулюють процеси активації і гальмування ГГНС. Ангіотензин

може залучатися до механізмів гальмування секреції АКТГ при дії надлишку глюкокортикоїдів, але на відміну від КРФ і вазопресину не включатися в механізми активації синтезу і секреції АКТГ після адrenaлектомії. Про різну фізіологічну роль КРФ і ангіотензину II в регуляції секреції АКТГ свідчить різний характер впливу стресу і адrenaлектомії на КРФ - і ангіотензинові рецептори в гіпоталамусі і аденогіпофізі [E.Castren, 1989]. За даними ряду дослідників [E.Buckner, 1986, M.Keller-Wood, 1987], центральна ангіотензинова система не залучається також до стимуляції секреції АКТГ при дії стресів. Таким чином, можна зробити висновок, що в регуляцію секреції АКТГ в різних умовах - при нестачі (адrenaлектомія) чи надлишку кортикостероїдів (стреси, введення екзогенних кортикостероїдів і АКТГ) можуть залучатися різні нейропептиди.

#### Зміни активності ангіотензинової системи мозку та функціонального стану ГНС щурів під впливом каптоприлу

Висновок про важливе значення змін вмісту і рецепції ангіотензину II в гіпоталамусі і аденогіпофізі щурів в механізмах реалізації впливу кортикостероїдів на кортикотропну функцію за принципом зворотнього зв'язку підтверджується результатами дослідів з введенням специфічного інгібітору АПФ - каптоприлу. При дослідженні впливу перорального введення каптоприлу на активність ангіотензинової системи виявлено, що через 2 год після одноразового введення препарату в дозі 10 мг/кг інтактним тваринам активність АПФ знижується в медіо-базальному гіпоталамусі, аденогіпофізі і плазмі крові щурів (на 22,5%, 28,2%, 25,4%, відповідно). Через 4 год після введення каптоприлу знижений рівень ферментативної активності спостерігається в передньому і медіо-базальному гіпоталамусі, довгастому мозку і плазмі крові (зниження на 17,1%, 13,6%, 21,7%, 24,4%, відпо-

відно). Активність АПФ в аденогіпофізі через 4 год після введення каптоприлу нормалізується. Через 4 год після введення каптоприлу в більшій дозі - 25 мг/кг спостерігається більш виразне зниження активності АПФ в передньому і медіо-базальному гіпоталамусі та аденогіпофізі (на 37,2%, 26,1%, 38,2%). Зниження активності АПФ спостерігається також в надниркових залозах - на 21,3%. Про гальмування активності АС при дії каптоприлу свідчить також зниження вмісту ангіотензину II в гіпоталамусі і довгастому мозку через 4 год після введення препарату.

Зниження активності АПФ після введення каптоприлу відмічено також в медіо-базальному гіпоталамусі, аденогіпофізі і крові щурів з одно- і двобічною адреналектомією. У щурів з експериментальним гіперкортицизмом в тих структурах мозку, де за умов введення гідрокортизону активність АПФ підвищується (а саме - в довгастому мозку і стріатумі), введення каптоприлу також супроводжується зниженням активності ферменту.

Враховуючи важливу роль центральної АС в регуляції артеріального тиску [Р.Реттиг и др., 1983; F.Consolimcolombo et al. 1996], можна вважати, що виявлене нами зниження активності системи в гіпоталамусі і довгастому мозку при введенні каптоприлу має важливе значення у гіпотензивній дії цього препарату.

Зниження активності АПФ і рівня ангіотензину II в структурах мозку, крові і надниркових залозах в умовах перорального введення каптоприлу супроводжується гальмуванням функціональної активності ГНС у інтактних і адреналектомованих щурів. Через 2 і 4 год після одноразового введення каптоприлу інтактним тваринам в дозі 10 і 50 мг/кг спостерігається зниження рівня 11-ОКС і одночасне зниження рівня АКГГ в плазмі крові. Тривалість ефекту препарату залежить від дози. Введення каптоприлу адреналектомованим щурам (після одно- і двобічної операції)

також призводить до зниження рівня АКТГ, підвищеного після адреналектомії. Отже, виявлений під впливом каптоприлу характер змін рівня 11-ОКС і АКТГ в крові інтактних і адреналектомованих щурів свідчить про те, що зниження рівня 11-ОКС обумовлено зниженням секреції АКТГ. Останнє може бути результатом впливу каптоприлу на центральні ланки АС, а саме, результатом зниження активності АПФ і рівня ангіотензину II в гіпоталамусі і аденогіпофізі. Ці дані підтверджують висновок, що зниження активності ангіотензинової системи в гіпоталамусі, гіпофізі і лімбічних структурах мозку в умовах надлишку ендогенних і екзогенних глюкокортикоїдів може бути одним з нейроендокринних механізмів гальмування секреції КРФ і АКТГ.

#### **Взаємодія ангіотензинової і енкефалінової систем мозку і гіпофізу в нормі та при експериментальній патології ГНС**

Реалізація ефектів каптоприлу на функціональний стан ГНС може здійснюватися не тільки через зміни РАС, а також шляхом впливу на інші пептидні системи. Враховуючи дані фізіологічних досліджень про взаємодію ЕОС і РАС [Г.Я.Шварц, И.Ф.Фармарк, 1987; S.Kaneko, S.Tamura, 1985], а також важливість такої взаємодії в регуляції функції ГНС, ми досліджували вплив інгібітору АПФ - каптоприлу на активність ЕОС мозку, а також вплив аналогу лей-енкефаліну - даларгіну на активність АПФ і вміст ангіотензину II у експериментальних тварин. Встановлено, що через 4 год після введення каптоприлу інтактним щурам вміст лей-енкефаліну підвищується в передньому гіпоталамусі і аденогіпофізі. Враховуючи наведені вище дані про інгібування каптоприлом активності АПФ в мозку і гіпофізі щурів, а також дані літератури щодо участі АПФ поряд з енкефаліназою А в інактивації енкефалінів [G.Sander, 1980; S.Dyer, 1990], підвищення вмісту лей-енкефаліну при введенні каптоприлу інтактним щурам,

очевидно, зв'язано з уповільненням деградації пептиду. За даними літератури, введення каптоприлу посилює і пролонгує анальгетичні ефекти лей- і мет-енкефалінів [Г.Я.Шварц, И.Ф.Фармарк, 1987], а також підвищує рівень мет-енкефаліну в клітинах нейробластоми [R.Folkesson, 1988]. Введення каптоприлу щурам на 4-ий день після однобічної та на 7-ий день після двобічної адреналектомії супроводжується незначним підвищенням рівня лей-енкефаліну в гіпоталамусі і аденогіпофізі.

При дослідженні характеру впливу даларгіну на активність ангіотензинової системи встановлено підвищення активності АПФ і вмісту ангіотензину II в передньому, медіобазальному гіпоталамусі і в аденогіпофізі через 1 год після введення пептиду. Через 4 год після введення даларгіну активність АПФ в гіпоталамусі і в гіпофізі нормалізувалась. Враховуючи ці результати, а також дані про вплив інгібітора АПФ на ендогенну ЕОС, можна зробити висновок, що АПФ є одним з важливих ланцюгів в механізмі функціональної взаємодії ангіотензинової і енкефалінової систем гіпоталамусу і аденогіпофізу.

Аналіз одержаних даних дає підставу зробити висновок, що зниження секреції АКТГ і кортикостероїдів при введенні каптоприлу є результатом впливу препарату на центральні пептидергічні механізми, а саме - зниження активності ангіотензинової системи і підвищення рівня лей-енкефаліну в гіпоталамусі і гіпофізі. Дію даларгіну на функціональний стан ГНС можуть також опосередковувати ангіотензини мозку.

**Роль ренин-ангіотензинової системи в патогенезі гіпертензивного синдрому при хворобі Іценка-Кушинга і обґрунтування доцільності використання каптоприлу при цій патології**

Зміни активності РАС, ККС і ЕОС в гіпоталамусі, лімбічних структурах мозку і аденогіпофізі, виявлені в наших експеримен-

тах при підвищенні рівня кортикостероїдів в організмі, можуть виникати при стресах і різних патологічних станах у людей. Ці зміни можуть бути важливими факторами порушення механізмів регуляції ГГНС та важливою складовою нейропатогенетичних механізмів розвитку хвороби Іценка-Кушинга.

Вивчення патогенетичних механізмів різних форм гіперкортицизму у хворих в клініці ІЕОР ім.В.П.Комісаренка обмежувалось дослідженнями периферичних ланок ПАС. Активність ключового ферменту ПАС - АПФ вивчалась в крові і надниркових залозах у хворих з хворобою і синдромом Іценка-Кушинга, а також в крові хворих НЕОГС і ВСГС, клінічна симптоматика яких нагадує хворобу Іценка-Кушинга. Згідно з одержаними даними, активність АПФ крові в групі первинних хворих на ХІК, які не отримували специфічного лікування, нижче ніж в контрольній групі. Підвищення активності АПФ крові спостерігається у хворих на ХІК, які проходили курс комбінованої консервативної терапії (застосування блокаторів функції ГГНС центральної і периферичної дії - накому, парлоделу, перітолу, резерпіну, хлодітану та ін., а також телегаматерапії). При цьому виявлена істотна різниця в активності АПФ крові між хворими з різним ступенем тяжкості захворювання. Найбільш високий рівень ферментативної активності відмічено в групі хворих з тяжкою формою ХІК, терапія яких включала застосування блокаторів ГГНС та телегаматерапію. В порівнянні з консервативною терапією, в групі хворих на ХІК після хірургічного втручання (одно- та двобічна деструкція і видалення надниркових залоз) рівень активності АПФ виявився близьким до контрольних значень. При дослідженні хворих з синдромом Іценка-Кушинга не виявлено суттєвих змін активності АПФ у осіб з гормональноактивними кортикостеромами.

Більш низький в порівнянні з контролем рівень активності

АПФ в крові первинних хворих на ХІК узгоджується з результатами експериментальних досліджень. У щурів з гіперкортицизмом, який моделювали багаторазовим введенням гідрокортизону на фоні підвищення середнього артеріального тиску, виявлено зниження активності АПФ крові в порівнянні з контролем. Цікаво, що зниження активності пресорних систем крові, зокрема РАС, було виявлено в стадії стабільного підвищення артеріального тиску при гіпертонічній хворобі [Л.Т.Малая, 1981; И.К.Шхвацабая, 1980].

Підвищення активності АПФ крові до нормального чи вищого за норму рівня у хворих на ХІК, які отримували специфічне лікування, може бути пов'язано з частковою нормалізацією базального рівня АКТГ і кортизолу в крові. Це було виявлено у хворих після курсу лікування хлодитаном [А.А.Яковлев, Е.В.Лучицкий, 1977], перитолом сумісно з хлодитаном [Е.В.Лучицкий, 1990], та після тотальної адреналектомії [И.В.Комиссаренко, С.И.Рыбаков, 1977]. У обстежуваних нами хворих на ХІК після специфічного лікування також відмічена нормалізація рівня екскреції 17-ОКС.

Результати досліджень інших компонентів РАС крові, зокрема реніну свідчать про те, що у хворих з хворобою та синдромом Іценка-Кушинга активність ферменту в крові може бути підвищеною, нормальною, чи зниженою [И.В.Комиссаренко, А.А.Яковлев, 1982; С.Е.Попов, Н.П.Маслова, 1983; P.Greminger, 1982]. Цікаво, що підвищена активність реніну була виявлена в крові хворих з тяжкою формою ХІК в стадії загострення і залишалась значно підвищеною після курсу лікування хлодитаном [И.В.Комиссаренко, А.А.Яковлев, 1982], що в певній мірі узгоджується з нашими даними відносно підвищеної активності АПФ в крові хворих з тяжкою формою ХІК, а також у хворих, які проходили курс консервативної терапії з застосуванням блокаторів ГГНС.

При дослідженні АПФ в надниркових залозах хворих з гіпер-

кортицизмом, було встановлено підвищення ферментативної активності в гіперплазованій тканині кори надниркових залоз хворих на ХІК. Найвищу активність ферменту виявили в гормональноактивних кортикостеромах і альдостеромах. Враховуючи медіаторну роль ангіотензину II, який міститься в надниркових залозах, в біосинтезі альдостерону [P.Gupta et al., 1995; I.Kifor, 1991], виявлене нами підвищення активності АПФ в наднирниках хворих з хворобою та синдромом Іценка-Кушинга може бути одним з факторів, які зумовлюють підвищену секрецію альдостерону у цих хворих, а особливо у хворих з гормональноактивними пухлинами - альдостеромами, що відмічено в ряді робіт [Т.П.Безверкая, 1985; И.В.Комисаренко, 1984; S.Scaccianoce, 1989; Schiavone, 1986].

Отже, участь ангіотензину II в патогенезі гіпертензивного синдрому у хворих на ХІК і СІК може бути обумовлена прямою вазоконстрикторною дією пептиду, нейрогенною його дією (через ЦНС), а також стимулюючою дією циркулюючого та локалізованого в надниркових залозах ангіотензину II на секрецію альдостерону. Необхідно також враховувати можливу участь інших тканинних ангіотензинів в патогенезі гіперкортицизму. Складність оцінки ролі РАС в патогенезі гіпертензій полягає в тому, що підвищення артеріального тиску може бути пов'язане з підвищенням реактивності судин до циркулюючого ангіотензину, а також з підвищенням активності тканинних РАС в мозку, гіпофізі, наднирниках, яке не супроводжується збільшенням активності реніну, АПФ і вмісту ангіотензину II в плазмі крові. За результатами наших досліджень, у хворих на хворобу Іценка-Кушинга не відмічена кореляція між рівнем АТ і активністю АПФ крові. Разом з тим, в експерименті показано, що активність центральної АС в умовах гіперкортицизму підвищується в довгастому мозку й стріатумі. При дослідженні РАС надниркових залоз виявлено підвищення ак-

тивності АПФ у тварин з експериментальним гіперкортицизмом, а також у хворих з синдромом і хворобою Іценка-Кушинга. Визначення коефіцієнтів кореляції дозволило встановити виразану позитивну корелятивну залежність між активністю АПФ в гіперплазованій тканині та в пухлинах кори надниркових залоз і рівнем систолічного АТ у хворих з хворобою і синдромом Іценка-Кушинга. Виходячи з цього, питання про роль РАС (циркулюючої і локалізованої в різних тканинах) в патогенезі гіпертензивного синдрому при ХІК можна вирішити за допомогою інгібіторів цієї системи. Найбільшу увагу серед них привертають інгібітори АПФ, зокрема, каптоприл, який специфічно блокує утворення вазоактивного пептиду ангіотензину II.

Дослідження показали, що одноразова проба з каптоприлом виявилась позитивною у 75% хворих на ХІК з артеріальною гіпертензією 160/110 - 220/140 мм.рт.ст. Зниження АТ у хворих ХІК після прийому каптоприлу свідчить про те, що ангіотензин II є важливим фактором в механізмі розвитку гіпертензії при ХІК, оскільки основним механізмом дії каптоприлу є зниження утворення цього пептиду. Дослідження АПФ показали, що антигіпертензивний ефект каптоприлу не корелює з вихідним рівнем ферменту в плазмі крові хворих на ХІК: препарат знижує АТ у хворих як з підвищеною, так і з нормальною і зниженою вихідною активністю АПФ крові. При цьому в перших двох групах хворих каптоприл знижує активність АПФ крові. Аналіз цих результатів, а також експериментальних даних про гальмування каптоприлом активності АПФ та утворення ангіотензину II в мозку, гіпофізі та надниркових залозах свідчить про те, що у гіпотензивній дії каптоприлу важливу роль відіграє інгібування АПФ в різних органах та тканинах, зокрема, в надниркових залозах і мозку. Це припущення підтверджують результати фізіологічних експеримен-

тів, які показали, що центральна дія каптоприлу може знижувати АТ при відсутності периферійного інгібування АПФ у спонтанно-гіпертензивних щурів [T.Unger et.al.,1981, 1990].

Враховуючи вищенаведене, можна зробити висновок, що визначення реакції АТ на одноразову дозу каптоприлу має більшу прогностичну цінність ніж визначення вихідної активності реніну і АПФ в крові, оскільки зниження АТ може бути наслідком дії каптоприлу не тільки на циркулюючий ангіотензин II, а на РАС різних органів і тканин. Проби з каптоприлом дозволяють виділити групу хворих на ХІК з гіпертензивним синдромом, у яких включення препарату в комплексну терапію буде ефективним.

#### Порушення реакції АПФ крові хворих на НЕОГС і ВСГС при застосуванні стимулюючих тестів

Обстеження хворих на НЕОГС та ВСГС показали, що активність АПФ крові в стані спокою істотно не відрізняється від ферментативної активності у здорових людей. Застосування різних стимулюючих тестів (дозоване велоергометричне навантаження, введення інсуліну та фуросеміду) дало змогу виявити відмінності реакції ферменту у хворих і здорових людей. Було показано, що активність АПФ плазми крові не змінюється під час фізичних навантажень у здорових людей, але дуже відрізняється за рівнем реактивності у хворих з гіпертензіями гіпоталамічного генезу - спостерігається як відсутність змін активності ферменту, так і підвищення його активності (у 57 % хворих на ВСГС та 67 % хворих на НЕОГС). У деяких хворих спостерігається значне підвищення активності АПФ під час фізичного навантаження. Зважаючи на участь РАС в системі довгострокової регуляції артеріального тиску та в механізмах стабілізації артеріальної гіпертензії [Л.Т.Малая, 1981], підвищення активності АПФ під час функціональних навантажень і після їх припинення може бути

одним з важливих чинників зміни АТ у хворих на НЕОГС та ВСГС.

Аналіз результатів дослідження впливу стимулюючих тестів на АПФ свідчить про те, що активність ферменту в крові хворих на НЕОГС не підвищується у відповідь на інсулінову гіпоглікемію та введення фуросеміду, в той час як у здорових людей активність АПФ зростала через 30 хв після введення препаратів. Ці дані узгоджуються з результатами досліджень інших компонентів РАС, зокрема реніну і ангіотензину II, підвищення рівня яких не виявлено у хворих на НЕОГС після введення інсуліну та фуросеміду, як це спостерігається у здорових людей [В.Н.Славнов, В.В.Марков и др. 1992]. Порушення реакції на інсулінову гіпоглікемію встановлено також при дослідженні ГНС та секреції вазопресину у хворих на НЕОГС [Е.В.Луцицкий, 1990; В.Н.Славнов, В.А.Олейник, 1988]. Протягом усього часу після введення інсуліну автори не спостерігали збільшення вмісту АКГР, кортизолу і вазопресину в крові цих хворих. Виявлені особливості порушень компонентів РАС та рівня гормонів ГНС у хворих на НЕОГС можуть бути взаємообумовлені, враховуючи дані про існування функціональних зв'язків між периферичною РАС і ГНС. Після курсу лікування парлоделом і перитолом протягом 3-х місяців реакція АПФ крові на інсулінову гіпоглікемію та введення фуросеміду нормалізується у 54 - 64 % хворих на НЕОГС. Слід зауважити, що клінічна ремісія після вживання парлоделу та перитолу спостерігалась у 55 - 60 % хворих на НЕОГС [Е.В.Луцицкий, 1990]. Результати проведених досліджень підтверджують висновки [Е.В.Луцицкий, 1990], що ефект препаратів, які впливають на обмін біогенних амінів, здійснюється як через центральні, так і через периферичні механізми і, зокрема, через периферичну РАС.

Отже, порушення реакції АПФ крові на інсулінову гіпоглікемію та дію дозованого фізичного навантаження у хворих на НЕ-

ОГС та ВСГС свідчить про зміни процесу утворення ангіотензину II в умовах стресу та активації ГГНС і можуть бути пов'язані з порушенням центральних регуляторних механізмів в ГГНС. За даними В.Н.Славнова і В.А.Олейника [1988] та Е.В.Луцицького [1990] ці порушення виявляються в значному підвищенні базального рівня гормонів ГГНС - АКТГ, кортизолу, вазопресину,  $\beta$ -ендорфіну,  $\alpha$ -МСТ в стані спокою та відсутністю реакції або парадоксальною реакцією цих гормонів і пептидів на стимулюючі тести. Враховуючи дані літератури про локалізацію патологічного процесу при НЕОГС і ВСГС в гіпоталамусі [В.А.Алмазов, 1988, В.А.Дибенко, 1992], порушення реакції АПФ крові при активації ГГНС може бути одним з гуморальних факторів, за допомогою яких гіпоталамус формує гіпертензивні стани. Тобто, ангіотензиновий механізм гомеостазу є одним з патогенетичних факторів розвитку артеріальної гіпертензії при НЕОГС і ВСГС. Визначення активності АПФ у хворих на НЕОГС та ВСГС при дії навантажувальних тестів може бути використано для оцінки функціонального стану цієї системи, а також доцільності використання фармакологічних препаратів у терапії гіпертензій гіпоталамічного генезу.

Таким чином, одержані при виконанні цієї роботи результати свідчать, по-перше, про участь ЕОС, ККС і АС в нейрохімічних механізмах дії кортикостероїдів на головний мозок. По-друге, показано важливе значення змін вмісту, метаболізму і рецепції ангіотензину II і лей-енкефаліну в центрах регуляції ГГНС в механізмах реалізації впливу кортикостероїдів на кортикотропну функцію аденогіпофізу при патологіях ГГНС - гіпер- і гіпокортицизмі. По-третє, враховуючи вищенаведене, зміни активності РАС, ККС і ЕОС в гіпоталамусі, лімбічних структурах мозку і аденогіпофізі при підвищенні рівня кортикостероїдів в організмі, що виникають при стресах і різних патологічних ста-

нах, можуть бути важливими факторами порушення механізмів регуляції ГГНС та важливою складовою нейропатогенетичної основи виникнення хвороби Іценка-Кушинга. В-четвертих, у хворих з різними формами гіперкортицизму виявлені порушення периферичних ланок РАС - активності АПФ крові і надниркових залоз. Застосування інгібітору АПФ - каптоприлу в клініці і експерименті показало, що важливим фактором в патогенезі гіпертензивного синдрому при гіперкортицизмі є РАС різної тканинної локалізації - крові, надниркових залоз і мозку.

### В И С Н О В К И

1. Зміни активності енкефалінової, калікреїн-кінінової і ангіотензинової систем в структурах мозку, гіпофізі, надниркових залозах і крові щурів при дії гідрокортизону і АКГГ мають регіональну та тканинну специфічність і залежать від вихідного гормонального фону і тривалості дії гормонів.

2. Одно- і багаторазове введення гідрокортизону і АКГГ призводить до зниження рівня лей-енкефаліну в структурах мозку внаслідок посилення процесів вивільнення і інактивації пептиду, а також транспорту його в кров і аденогіпофіз. Після одноразового введення гормонів вміст лей-енкефаліну нормалізується через 4 години.

3. Після двобічної адреналектомії зміни рівня лей-енкефаліну носять двофазний характер: зниження вмісту пептиду в гіпоталамусі, стріатумі і аденогіпофізі на 7-ий день після операції внаслідок посилення вивільнення пептиду з нейросекреторних гранул та підвищення його вмісту до нормального рівня на 10-ий день після адреналектомії. Введення гідрокортизону адреналектомованим щурам призводить до часткової нормалізації обміну і рецепції лей-енкефаліну в структурах мозку.

4. Активация центральних опіоїдних механізмів в гіпоталамусі і аденогіпофізі після периферичного введення аналогу лей-енкефаліну - даларгіну супроводжується гальмуванням активності ГНС - зниженням рівня 11-ОКС і АКТГ в крові інтактних та адреналектомованих щурів.

5. В умовах гіперкортицизму відбувається зниження активності калікреїн-кінінової системи в гіпоталамусі і інших структурах мозку за рахунок зниження активності калікреїну, вмісту калікреїногену і підвищення активності кінінази I. Адреналектомія викликає підвищення активності калікреїну, вмісту калікреїногену та зниження активності кінінази I в гіпоталамусі, лімбічних структурах мозку, гіпофізі і крові, що свідчить про підвищення активності ККС. Введення гідрокортизону адреналектомованим щурам призводить до нормалізації активності ККС в гіпокампі, стріатумі, довгастому мозку і гіпофізі.

6. Підвищення рівня глюкокортикоїдів після одно- і багаторазового введення гідрокортизону і АКТГ призводить до змін вмісту, процесів протеолітичного процесінгу і рецепції ангіотензину II; при цьому в гіпоталамусі, аденогіпофізі і крові активність ангіотензинової системи знижується, а в довгастому мозку, стріатумі і надниркових залозах - підвищується. Після адреналектомії у всіх структурах мозку, аденогіпофізі і крові встановлено зниження активності ангіотензинової системи: знижується активність АПФ, вміст і рецепція ангіотензину II. Після введення адреналектомованим щурам гідрокортизону відмічена нормалізація обміну ангіотензину II в гіпокампі, стріатумі і гіпофізі.

7. Зниження активності ангіотензинової системи в гіпоталамусі, аденогіпофізі, довгастому мозку, надниркових залозах і крові після перорального введення інгібітору АПФ - каптоприлу

супроводжується гальмуванням активності ГНС - зниженням рівня АКФ і 11-ОКС в крові інтактних і адrenaлектомованих щурів.

8. Одним з важливих ланцюгів в механізмах взаємодії центральних ангіотензинової і енкефалінової систем в нормі і при патології ГНС є АКФ. Введення каптоприлу викликає підвищення вмісту лей-енкефаліну, а введення даларгіну призводить до підвищення активності АКФ і вмісту ангіотензину II в гіпоталамусі і гіпофізі щурів.

9. У первинних хворих на хворобу Іценка-Кушинга активність АКФ крові знижена; підвищення її до нормального чи вищого за норму рівня у цих хворих спостерігається після адrenaлектомії та специфічного лікування блокаторами ГНС. У хворих на хворобу і синдром Іценка-Кушинга виявлено значне підвищення активності АКФ у гіперплазованій тканині кори надниркових залоз та в гормональноактивних пухлинах - кортикостеромах і альдостеромах. Виявлено кореляційний зв'язок між активністю АКФ в цих тканинах і рівнем артеріального тиску.

10. Застосування каптоприлу призводить до зниження артеріального тиску у хворих на хворобу Іценка-Кушинга незалежно від базальної активності АКФ крові, що свідчить про залучення тканинних ангіотензинів (надниркових залоз і мозку) до механізму розвитку гіпертензії при хворобі Іценка-Кушинга. Позитивна проба з каптоприлом дозволяє виділити групу хворих, у яких включення препарату в комплексну терапію буде ефективним.

11. У хворих на нейроендокринно-обмінну та вегето-судинну форми гіпоталамічного синдрому активність АКФ плазми крові в стані спокою не відрізняється від здорових людей. Порушення реакції ферменту у хворих виявлено при застосуванні різних стимулюючих тестів - велоергометричного навантаження, введення інсуліну та фуросеміду. Після курсу лікування парлоделом і пе-

ритолом реакція АПФ крові на інсулінову гіпоглікемію та введення фуросеміду нормалізувалось у 54-64 % хворих на НЕОГС.

12. Зміни метаболізму і рецепції нейропептидів є важливими факторами в механізмах регуляції нейроендокринних і інших функцій мозку в умовах гіпер- і гіпокортицизму.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Визначення активності АПФ плазми крові у хворих на хворобу Іценка-Кушинга, НЕОГС та ВСГС в стані спокою і при застосуванні різних стимулюючих тестів може бути використано для оцінки функціонального стану РАС, її ролі в розвитку гіпертензії, а також доцільності використання фармакологічних препаратів в терапії гіпертензій гіпоталамічного генезу.

2. Визначення реакції артеріального тиску на одноразові дози інгібітору АПФ - каптоприлу, який призводить до зниження артеріального тиску у хворих на хворобу Іценка-Кушинга з артеріальною гіпертензією, має більшу прогностичну цінність ніж визначення вихідної активності реніну і АПФ крові в стані спокою і дозволяє виділити групу хворих ХІК з гіпертензивним синдромом, у яких включення препарату в комплексну терапію буде ефективним.

### **ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Вплив гідрокортизону та АКТП на амінопептидазну активність сірої речовини великих півкуль мозку інтактних і адреналектомованих тварин // Доповіді АН УССР.- 1977, N 2, сер.Б.- С. 157 - 160.

2. Изменения кининазной активности в головном мозге крыс после адреналектомии и последующего введения гидрокортизона // Докл. АН УССР.- 1981.- N 12, сер.Б.- С. 61 - 64. (соавт.: Кононенко В.Я.).

3. Протеиназная и фосфатазная активность гипофиза крыс в условиях экспериментального гипокортицизма // Докл. АН УССР.- 1982. - N 2, сер.Б.- С. 53 - 55.

4. Исследование активности ливосомных ферментов головного мозга крыс при иаменениях уровня гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы // Нейрохимия.- 1983. - 2, N 4.- С.402 - 411. (соавт.: Кононенко В.Я.)

5. Изменение активности ферментов ренин-ангиотензиновой и кининовой систем мозга крыс в условиях адреналэктомии и введения гидрокортизона // Укр. биохим.ж.- 1985. - 57, N 3.- С. 35 - 40. (соавт.: Кононенко В.Я., Яковлев А.А.).

6. Влияние гидрокортизона на активность ангиотензинпревращающего, рениноподобного ферментов и кининазы 1 в головном мозге и гипофизе крыс // Пробл. эндокринологии.- 1986.- 32, N 4. - С. 72 - 74. (соавт.: Кононенко В.Я., Яковлев А.А.).

7. Влияние гидрокортизона и кортикотропина на активность энкефалин-гидролизующих пептидаз головного мозга крыс // Докл. АН УССР, - 1986.- N 10. сер.В. - С. 56 - 58. (соавт.: Кононенко В.Я.).

8. Effect of hydrocortisone on the activity of angiotensin converting, renin-like enzymes and kininase 1 in rat brain and hypophysis // Neuroscience and Behavioral Physiology. - 1987. - 1,- P. 40 - 42. (соавт.: Kononenko V.Ya., Yakovlev A.A.).

9. Изменение активности ангиотензинообразующей системы мозга крыс при введении кортикотропина // Докл. АН УССР, 1987. N 10.- С. 71 - 74.

10. Действие кортикостероидов на энкефалинергическую систему мозга и гипофиза крыс // Эндокринология.- Киев: Здоровья, 1991.- вып. 21. - С. 112 - 119.

11. Interaction of angiotensins and enkephalins with hormones of hypothalamo-pituitary adrenal axis // J.Endocrinol. Invest.- 1991. - 14., suppl 4 - 6. - P. 231 - 232. (соавт.: Kononenko V.Ya.).

12. Зміни активності ренин-ангіотензинової системи мозку та функціонального стану гіпофізарно-надниркової системи щурів під впливом каптоприлу // Фізіол. журн. - 1992. - 38, N 1. - С.3 - 8. (співавт.: Тронько М.Д., Кононенко В.Я., Затовська Т.В.).

13. Влияние гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на активность калликреина и содержание калликреиногена в мозге и гипофизе крыс // Докл. АН Украины - 1993. - N 4. сер. В. С. 165 - 168.

14. Вивчення активності ангіотензин-перетворюючого ферменту

крові при гіпертензіях гіпоталамічного генезу // Ендокринологія.- Київ: Здоров'я, - 1994, - вип. 23.- С. 105 - 110. (співавт.: Славнов В.М., Каменецька М.С., Марков В.В.).

15. Вивчення ролі ренін-ангіотензинової системи в патогенезі гіпертензивного синдрому при хворобі Іценка-Кушинга і обґрунтування доцільності використання каптоприлу при цій патології // Доповіді НАН України.- 1995.- N 12.- С. 113 - 116. (співавт.: Кононенко В.Я., Комісаренко І.В.).

16. Активність енкефалінергічної системи мозку та гіпофізу за умов експериментального гіпокортицизму // Фізіол. журн. - 1995.- 41, N 5-6.- С. 61 - 66. (співавт.: Кононенко В.Я.).

17. Взаимодействие ренин-ангиотензиновой и энкефалинергической систем мозга и гипофиза в норме и при экспериментальной патологии гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса // Физиол. журнал им. И.М. Сеченова.- 1996.- 82, N 4.- С. 60 - 64. (соавт.: Кононенко В.Я.).

#### **Інформаційний лист**

18. Застосування проб з каптоприлом з метою обґрунтування доцільності його використання при хворобі Іценка-Кушинга з вираженим гіпертензивним синдромом та з'ясування патогенетичної ролі ренін-ангіотензинової системи в цій патології // Інформаційний лист, Київ, 1993. Вип. 2 по проблемі "Ендокринологія". співавт. Кононенко В.Я., Комісаренко І.В.).

Крім того, за матеріалами дисертації опубліковано 25 тез доповідей на міжнародних та республіканських з'їздах, конференціях і симпозиумах.

#### **АННОТАЦІЯ**

Калинская Л.Н. Нейроэндокринные функции энкефалиновой, калликреин-кининовой и ангиотензиновой систем в условиях гипер- и гипокортицизма.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.14 - эндокринология; Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П.Комиссаренко АМН Украины, Киев, 1997.

Диссертационная работа посвящена исследованию участия энкефалиновой, калликреин-кининовой и ангиотензиновой систем в механизмах действия кортикостероидов на лимбические структуры мозга и гипофиза, а также роли нейропептидов в регуляции кортикотропной функции при гипер- и гипокортицизме. Установлено, что основные нейрохимические процессы, обеспечивающие функционирование пептидергических систем (синтез, протеолитический

процессинг, рецепция и инактивация) вовлечены в механизм действия кортикостероидов на мозг. Показано, что изменения содержания лей-энкефалина и ангиотензина II в гипоталамусе и аденогипофизе являются важным нейроэндокринным механизмом регуляции кортикотропной функции при патологии ГННС. Нарушения периферических звеньев РАС - активности АПФ в надпочечниках и в плазме крови (изменения базального уровня и реакции на различные стимулирующие тесты) являются одним из патогенетических факторов в развитии артериальной гипертензии при болезни Иценко-Кушинга, нейроэндокринно-обменной и вегето-сосудистой форме гипоталамического синдрома.

#### ANNOTATION

Kalynska L.M. Neuroendocrine functions of enkephalin, kallikrein-kinin and angiotensin systems in hyper- and hypocorticism. Dissertation for the Degree of Doctor of Biological Sciences, Speciality 14.01.14 - endocrinology; V.P.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

Thesis presents the experimental results of the role of enkephalin, kallikrein-kinin and angiotensin systems in the mechanisms of corticosteroid action on brain limbic structures and pituitary as well as the role of neuropeptides controlling the corticotrophic function in hyper- and hypocorticism. It has been established that principal neurochemical processes, providing the function of systems controlling peptides (synthesis, proteolytic processing, reception and inactivation) are involved in mechanism of corticosteroid action on brain. It has been shown that the changes in leu-enkephalin and angiotensin II contents of hypothalamus and adenohipophysis are significant neuroendocrine mechanism controlling the corticotropic function in HPAS pathology. Disorders of peripheral links of RAS - ACE activity in adrenals as well as in blood plasma (basal level, reaction to different stimulating tests) are one of pathogenetic factors in the development of arterial hypertension in Cushing's disease, neuroendocrine-metabolic and vegetovascular form of hypothalamic syndrome.

Ключові слова: глюкокортикоїди, АКТГ, головний мозок, ангиотензин II, лейцин-енкефалін, кініни, калікреїн, гіперкортицизм, гіпокортицизм, каптоприл, далагрін.

**АВ 37.469**

Віддруковано на різнографі в салоні «ТЕХНІКА ДЛЯ БІЗНЕСУ»  
СП «Різо-Принт».

Тираж 100 прим., умовн. друк. аркушів 2.0.  
М. Київ, вул. Ярославів Вал, 26,  
тел. 212-19-13, тел./факс 224-33-46.