

УДК 612.453.018.2:577.15.07.612.451

В. И. Кравченко, М. К. Алексеев

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ Кортикостероидов НА ИХ ОБРАЗОВАНИЕ В НАДПОЧЕЧНИКАХ

Среди механизмов, опосредующих действие кортикостероидов на функцию коры надпочечников, наряду с гипоталамогипофизарной регуляцией внимание исследователей привлекает непосредственное их влияние на надпочечники. Показано действие кортикостероидов на стероидогенез, синтез ДНК и РНК, белка, некоторые ферментативные процессы в надпочечниках [5, 9, 10]. В связи с этим, в качестве регуляторного механизма функции коры надпочечников предполагается прямое тормозное влияние кортикостероидов на собственный синтез на уровне надпочечников. Однако место действия кортикостероидов в биосинтетическом процессе образования гормонов остается невыясненным. Неясно также значение ауторегуляции гормоногенеза в общей регуляции функции надпочечников.

Методика исследований

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар весом 180—200 г и клеточных культурах коры надпочечников собак. Животных распределили на группы, согласно табл. 1 и 2. АКТГ «Synacthen» фирмы «Ciba» (Швейцария) вводили внутримышечно в дозе 2 ед/100 г, гидрокортизонацетат «Гедон Рихтер» (Венгрия) — 5 мг/100 г, однократно, либо ежедневно в течение семи дней, начиная со второго дня после операции. Гипофизэктомия производилась трансаурикулярно [6]. Критерием удаления гипофиза служили прекращение роста животных и соответственно прибавки их веса, резкое снижение почти до нуля содержания кортикостероидов в крови и отсутствие аденогипофиза в области турецкого седла при его ревизии по завершению опытов. Кортикостероиды крови определяли флуорометрически [8]. Надпочечниковую кровь собирали под нембуталовым наркозом (45 мг/кг внутривенно) [1]. Биосинтез кортикостероидов изучали в условиях отмеченных ранее [3] и исследовали их методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sylufol UW-254» (Чехословакия) [4]. Для изучения поглощения кортикостероидов тканями спиртово-бензольный раствор H^3 -гидрокортизона фирмы «CEA IRE Sorin» (Франция) с удельной активностью 55,6 Ки/ммоль, упаривали в токе азота, хроматографически очищали, растворяли в смеси этанола с физиологическим раствором в соотношении 1 : 10. Меченый стероид в количестве $5,5 \cdot 10^6$ расп./мин вводили в хвостовую вену в 0,5 мл физиологического раствора. Через 30 мин животных забивали декапитацией. Иссекали кусочки тканей весом 80—100 мг, гомогенизировали в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Кортикостероиды экстрагировали двойным объемом метилхлорида, 1 мл экстракта вносили в сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Радиоактивность проб измеряли на счетчике «Isoscar» фирмы «Nuclear Chicago».

Клеточную культуру надпочечников взрослых собак приготавливали методом трипсинизации [12]. Условия выращивания культур описаны ранее [2]. Каждые 48 ч питательную среду заменяли. На пятый день в культуральную среду вносили АКТГ «Synacthen» в количестве 50 мЕд, гидрокортизон — $0,3 \cdot 10^{-5}$; $0,9 \cdot 10^{-5}$; $1,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л или кортикостерон — $0,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л путем их растворения в питательной среде. Через 48 ч культуральную жидкость сливали для определения кортикостероидов.

Результаты исследований и их обсуждение

Однократное введение гидрокортизона контрольным животным на фоне стимуляции надпочечников АКТГ практически не изменяло содержания кортикостероидов в периферической и надпочечниковой крови.

Не было выявлено изменений и в биосинтезе кортикостероидов надпочечниковой тканью (табл. 1). У гипофизэктомированных крыс при сочетанном введении кортикотропина и гидрокортизона уровень гормона в надпочечниковой крови восстанавливался в меньшей степени, чем при введении только АКТГ. Такие же по своей направленности изменения выявлены в биосинтезе кортикостерона из эндогенных предшественников. Синтез кортикостерона из вносимого в инкубационную среду прегненолона ни после гипофизэктомии, ни после введения АКТГ и гидрокортизона не изменялся. Эти данные указывают на снижение функции коры надпочечников вследствие торможения биосинтеза кортикостероидов на этапе, предшествующем образованию прегненолона. В то же время сниженное образование кортикостерона после сочетанного введения гидрокортизона и АКТГ по сравнению с одним введением АКТГ свидетельствует о действии гидрокортизона на этой же стадии биосинтеза кортикостероидов при кратковременной его экспозиции.

Таблица 1

Влияние однократного введения гидрокортизона (F) и АКТГ на функцию коры надпочечников у крыс

Группа животных	Условия опыта	Вес надпочечников, мг/100 г веса тела	Концентрация кортикостерона в крови (мкг %)		Биосинтез кортикостерона (мкг/г/ч) из предшественников	
			периферическая	надпочечниковая	эндогенных	прегненолона
1	Контроль (6)	18,4±0,7	12,4±1,8	361±24,5	64,0±4,6	901±30,0
2	АКТГ (5)	21,0±1,6	23,5±2,5	390±33,4	85,0±5,0	931±66,8
3	АКТГ+F (5)	20,4±1,9	17,2±2,7	384±32,3	77,5±3,6	922±54,5
4	Гипофизэктомия (3)	14,4±2,0	5,4±1,8	4,8±1,23	14,2±2,1	836±190,0
5	Гипофизэктомия+АКТГ (5)	19,4±1,4	14,6±2,3	243±29,0	47,5±9,0	948±70,0
6	Гипофизэктомия+АКТГ+F (5)	16,8±1,5	10,0±2,1	145±21,3	26,2±5,3	918±36,3
	p_{1-2}	>0,05	<0,01	>0,05	<0,05	>0,05
	p_{2-3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	p_{1-4}	>0,05	<0,05	<0,01	<0,001	>0,05
	p_{4-5}	>0,05	<0,05	<0,001	<0,05	>0,05
	p_{5-6}	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

В скобках — количество наблюдений.

Еще более убедительные данные, свидетельствующие о возможности действия кортикостероидов по принципу ауторегуляции их образования, получены при длительном введении гидрокортизона. В этом случае сниженное содержание кортикостероидов в надпочечниковой крови при сочетанном введении гормонов по сравнению с введением только АКТГ наблюдалось как у животных с гипофизом, так и после его удаления. Сниженный уровень кортикостерона в периферической крови и биосинтеза глюкокортикоидов из эндогенных и экзогенных предшественников у гипофизэктомированных крыс при сочетанном введении АКТГ и гидрокортизона указывает на прямое действие глюкокортикоидов на функцию надпочечников. По сравнению с однократным введением гормонов биосинтез кортикостерона при длительном их введении был сниженным как из эндогенных, так и экзогенных предшественников. Торможение

биосинтеза кортикостерона из дезоксикортикостерона предполагает действие гидрокортизона на процесс 11 β -гидроксилирования, а из прегненолона — и на другие этапы биосинтеза глюкокортикоидов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние гипофизэктомии и многократного введения гидрокортизона (F) и АКТГ на функцию коры надпочечников у крыс

Группа животных	Условия опыта	Вес надпочечников, мг/100 г веса тела	Концентрация кортикостерона в крови (мкг %)		Биосинтез кортикостерона (мкг/г/ч) из предшественников		
			периферическая	надпочечниковая	эндогенных	прегненолона	дезоксикортикостерона
1	Контроль (8)	18,8 $\pm$ 1,4	19,0 $\pm$ 2,70	360 $\pm$ 29,4	53,6 $\pm$ 5,30	960 $\pm$ 82,0	1096 $\pm$ 130,0
2	АКТГ (6)	24,1 $\pm$ 0,9	13,3 $\pm$ 2,17	259 $\pm$ 43,6	96,0 $\pm$ 15,84	853 $\pm$ 31,3	1100 $\pm$ 94,0
3	АКТГ+F (5)	25,0 $\pm$ 1,7	11,9 $\pm$ 1,32	199 $\pm$ 38,7	62,8 $\pm$ 12,60	713 $\pm$ 105	894 $\pm$ 54,9
4	Гипофизэктомия (7)	7,4 $\pm$ 1,04	2,8 $\pm$ 0,65	3,1 $\pm$ 1,44	9,6 $\pm$ 1,60	658 $\pm$ 46,5	734 $\pm$ 55,8
5	Гипофизэктомия+АКТГ (7)	25,7 $\pm$ 1,7	14,4 $\pm$ 2,34	139 $\pm$ 17,8	74,9 $\pm$ 4,86	907 $\pm$ 150	969 $\pm$ 33,9
6	Гипофизэктомия+АКТГ+F (7)	21,8 $\pm$ 1,2	5,2 $\pm$ 1,99	47,2 $\pm$ 11,1	37,4 $\pm$ 5,38	634 $\pm$ 74,0	707 $\pm$ 86,9
p_{1-2}		$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$
p_{2-3}		$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$
p_{1-4}		$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$
p_{4-5}		$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$
p_{5-6}		$\angle 0,05$	$\angle 0,05$	$\angle 0,001$	$\angle 0,001$	$\angle 0,05$	$\angle 0,05$

В связи с обнаруженным эффектом гидрокортизона на биосинтез кортикостерона в надпочечниках представляется важным выяснение вопроса о возможности поглощения гормона этим органом для воспроизведения наблюдаемого действия. Опыты с меченым гидрокортизоном обнаружили существенное различие в накоплении гормона в разных тканях. Наивысшее его содержание наблюдалось (наряду с такими органами как печень и почки) в надпочечниках (см. рисунок). Эти исследования проводились без хроматографического выделения гидрокортизона, содержащегося в тканях, поэтому представленные данные отражают суммарное содержание как неизменного меченого гормона, так и продуктов его метаболизма. Тем не менее, учитывая литературные данные о поглощении кортикостероидов тканями [7], можно предполагать, что значительная часть выявляемой радиоактивности принадлежит гидрокортизону.

Значительная аккумуляция гидрокортизона в надпочечниках вместе с другими данными подтверждает возможность его прямого действия на образование глюкокортикоидов в надпочечниках. Все же исследования *in vivo* часто не позволяют исключить всего многообразия факторов, могущих оказать влияние на тот или иной процесс, поэтому воспроизведение опыта в условиях *in vitro* является убедительным доказательством в пользу предполагаемого механизма.

Как показали предварительные исследования, монослойная клеточная культура коры надпочечников собак способна секретировать гидрокортизон и кортикостерон, которые могут быть определены флуориметрически в виде суммарной концентрации 11-оксикортикостероидов. Образование 11-оксикортикостероидов в контрольных опытах было незна-

чительным и составляло в среднем $8,4 \pm 0,9$ мкг%. Внесение в пробирки с культурой гидрокортизона или кортикостерона повышало содержание этих гормонов в культуральной среде на величину, определяемую флуорометрически. Такой экспериментальный подход, хотя и не дает точного представления о происходящих качественных изменениях в биосинтезе кортикостероидов, все же свидетельствует о его количественном повышении или снижении.

Добавление в культуральную среду АКТГ вызывало стимуляцию синтеза глюкокортикоидов до 50, а иногда и более 100 мкг%. Эти вели-



чины и послужили исходным критерием для расчета количества вносимых в культуру кортикостероидов. В условиях одновременного внесения АКТГ и гидрокортизона содержание 11-ОКС в культуральной среде должно соответствовать сумме внесенного и образованного гормона. Наличие же несоответствия указывает на изменение образования кортикостероидов. Проведенные исследования показали, что внесение в культуральную жидкость гидрокортизона чуть более чем в три раза выше базального уровня гормонов подавляет образование кортикостероидов в нестимулированной культуре. На фоне стимуляции клеток надпочечников АКТГ торможение стероидообразования в этом же случае составило около 25% (табл. 3). Большие количества гидрокортизона, так же как и кортикостерона, вызывали полное подавление биосинтеза глюкокортикоидов клеточными культурами надпочечников собак.

Обсуждая механизм действия кортикостероидов на уровне надпочечников, можно предположить их влияние на связывание АКТГ рецеп-

Таблица 3
Влияние кортикостероидов на образование 11-оксикортикостероидов (мкг %) клеточными культурами коры надпочечников собак

Исследуемые показатели	Контроль	Внесение гормонов в культуральную среду					
		F $0,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л	АКТГ	АКТГ+F $0,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л	АКТГ+F $0,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л	АКТГ+F $1,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л	АКТГ+B $0,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л
Концентрация кортикостероидов в культуральной среде	$8,4 \pm 0,9$ (5)	$27,3 \pm 0,7$ (5)	$54,2 \pm 1,6$ (6)	$67,2 \pm 4,1$ (6)	$100 \pm 2,9$ (6)	$138 \pm 2,2$ (6)	$113 \pm 3,4$ (6)
Образование 11-оксикортикостероидов в культуре	$8,4 \pm 0,9$ (5)	0 (5)	$54,2 \pm 1,6$ (6)	$39,2 \pm 2,8$ (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)

F — гидрокортизон; B — кортикостерон; в скобках — количество наблюдений.

торами, однако воспроизведение эффекта АКТГ с помощью дибутирил цАМФ и проявление на его фоне ауторегуляторного влияния кортикостероидов [11] опровергает это предположение. Сопоставление результатов, полученных на животных и клеточных культурах надпочечников, указывает, что проявление этого регуляторного механизма наиболее существенно при длительном действии кортикостероидов на надпочечники. В связи с этим целесообразно предположить, что если гипоталамо-гипофизарная регуляция осуществляется практически мгновенно, то ауторегуляция на уровне надпочечников — при продолжительном изменении баланса кортикостероидов в организме. Что касается путей осуществления ауторегуляции стероидогенеза, то при непродолжительном воздействии кортикостероидов в данный механизм вовлекаются реакции, предшествующие образованию прегненолона, при длительном же воздействии — большинство реакций биосинтеза кортикостероидов.

Литература

1. Иваненко Т. И., Щедрина Р. Н., Кандрор М. И. Использование метода тонкослойной хроматографии для определения кортикостероидов в крови, оттекающей от надпочечников, и в ткани надпочечников крыс. — Пробл. эндокринолог., 1968, 14, № 1, с. 72—78.
2. Комиссаренко В. П., Турчин И. С., Онищенко Д. С. Цитологические и функциональные изменения в клеточной культуре надпочечников собак под влиянием АКТГ. — Пробл. эндокринолог., 1974, 20, № 3, с. 77—81.
3. Кравченко В. И. Влияние о, п'-ДДД на образование кортикостероидов. — Пробл. эндокринолог., 1973, 19, № 5, с. 76—78.
4. Кравченко В. И. Синтез кортикостероидов в надпочечниках цыплят при действии о, п'-ДДД. — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 2, с. 180—183.
5. Курченко И. Ф. К проблеме ауторегуляции гормоногенеза в коре надпочечников. Пробл. эндокринолог., 1975, 21, № 5, с. 63—68.
6. Федотов В. П., Баграмян Э. Р., Алешина Л. В. Методика трансаурикулярного удаления гипофиза у крыс различного веса. — Пробл. эндокринолог., 1971, 17, № 2, с. 102—105.
7. Bottoms G., Goetsch D. D. Subcellular distribution of the (^3H -) corticosterone fraction in brain, thymus, heart and liver of the rat. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1967, 124, N 2, p. 662—665.
8. De Moor P., Steeno O., Raskin M., Hendrix A. Fluorimetric determination of free plasma 11-hydrocorticosteroids in man. — Acta endocrinol. (Kbh), 1960, 33, N 2, p. 297—307.
9. Peron F. G., Moncloa F., Dorfman R. I. Studies on the possible inhibitory effects of corticosterone on corticosteroidogenesis of the adrenal level in the rat. — Endocrinol., 1960, 67, N 3, p. 379—389.
10. Saez J. M., Morera A. M., Gallet D. Opposite effects of ACTH and glucocorticoids on adrenal DNA synthesis in vivo. — Endocrinol., 1977, 100, N 5, p. 1268—1275.
11. Salmenperä M., Kahri A. I., Saure A. Effects of corticosterone on adrenocorticotrophin-induced mitochondrial differentiation with special reference to 11B- and 18-hydroxylation. — J. Endocrinol., 1976, 70, N 2, p. 215—222.
12. Younger J. S. Monolayer tissue cultures. Preparation and standartisation of tripsin dispared monkey kidney cells. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1954, 85, N 2, p. 202—205.

Киевский институт эндокринологии
и обмена веществ

Поступила в редакцию
19.IX 1978 г.