

6. Holly R. G., Barnard R. J., Rosenthal M. et al. Triathlete characterization and response to prolonged strenuous competition // *Med. Sci. Sports Exercise*.— 1986.— 18, N 1.— P. 123—127.
7. Novak J., Polivkova V., Steinerova A. et al. Selected plasma protein changes after triathlon competition // *Clin. Physiol*.— 1985.— 5, suppl. 4.— P. 187.
8. Novak J., Steinerova A., Polivkova V. Extremité vytrvalostní výkon z lékařského hlediska // *Teor. Praxe tel. vych.*— 1986.— 34, N 5.— S. 293—298.
9. Novak J., Svarc V., Havlíčková L., Bartunkova S. Odezva mineralogramu a vybraných hematologických parametrů na kombinované extrémní fyzické zatížení vytrvalostního charakteru // *Ces. Hyg.*— 1986.— N 6.— S. 330—336.
10. Novak M. Colorimetric ultramicromethod for the determination of free fatty acids // *J. Lipid. Res.*— 1965.— 6, N 3.— P. 431—433.
11. Rogers G., Goodman C., Mitchell D., Hattingh J. The response of runners to arduous triathlon competition. // *Eur. J. Appl. Physiol.*— 1986.— 55, N 4.— P. 405—409.
12. Semiginovsky B., Novak J., Bartunkova S., Havlíčková L. Functional and metabolic aspects of strenuous endurance exercise. IV. The endocrine regulation of anabolic processes. // *Physiol. Bohemoslov.*— 1984.— 33, N 6.— P. 560.
13. Steinerova A., Polivkova V., Jeschke J. et al. Extreme endurance performance from the physiological point of view. II. The changes in fat and carbohydrate parameters. // *Physiol. Bohemoslov.*— 1984.— 33, N 6.— P. 563.
14. Zuliani U., Bonetti A., Cerioli G. et al. Plasma lipids, lipoproteins and apoproteins B and A-1 before and after a 24 h endurance race in cross-country skiers // *J. Sports Med.*— 1986.— 26, N 1.— P. 8—10.

Тартус. ун-т
М-ва высш. и сред. спец. образования ЭССР

Поступила 10.03.87

УДК 591.1+612.65+677.175.534:612.06+577.175.642

Влияние кортизола на секрецию эстрадиола и его рецепцию в утренние и вечерние часы у самок крыс в 30-суточном возрасте

А. А. Тинников

Показано, что введение кортикостероидов в неонатальный период вызывает у самок крыс серьезные нарушения репродуктивной системы [5, 7, 21]. Эндокринные механизмы данного феномена активно изучаются, при этом в качестве важнейшего показателя нарушения рассматривается баланс глюкокортикоидов [7, 12, 22]. В частности, неонатальное введение глюкокортикоидов задерживает появление циркадных колебаний содержания кортикостерона (повышение его в вечерние часы и снижение в утренние) в крови развивающихся крыс, которое в норме происходит в 26—30-суточном возрасте [7, 12, 22]. Предполагается, что нарушение циркадного ритма активности надпочечников именно в этом возрасте, особенно важном для формирования репродуктивной функции [1, 18], может самым серьезным образом повлиять на развитие половой системы [7, 18]. Неонатальное введение глюкокортикоидов помимо ритма активности кортикостерона нарушает в данном возрасте и ритм активности прогестерона [7, 14]. В то же время не встречаются работы о влиянии такого воздействия на характер секреции другого полового стероида — эстрадиола. Известно, что в крови неполовозрелых крыс содержится значительное количество эстрадиола, причем секретируется он яичниками и надпочечниками [15, 16, 23].

Ранее нами было показано, что введение кортизола 5-суточным самкам крыс вызывает у них нарушение полового развития [5]. Целью данной работы явилось исследование влияния данного воздействия на характер секреции и рецепции эстрадиола и изменение его в течение дня у животных 30-суточного возраста.

Методика

Эксперимент проведен на самках крыс линии Вистар. На 5-е сутки после рождения формировали помет из восьми самок. Крысам опытной группы внутривенно вводили кортизол (в виде суспензии в 0,1 мл 15 %-ного этанола, приготовленного на физиологическом растворе), контрольной — 0,1 мл физиологического раствора с этанолом. Животных каждой экспериментальной группы метили и содержали в одном помете (четыре контрольных и четыре опытных крысы). В 25-суточном возрасте крысят отсаживали от матерей. На 30-е сутки жизни животных декапитировали утром (9.30—10.30) и вечером (16.30—17.30). Животных одного помета забивали одновременно. У крыс забирали кровь, яичники и надпочечники для инкубации *in vitro*, матку — для получения цитозоля. Яичники и надпочечники инкубировали в растворе Кребса—Рингера с добавлением глюкозы (11 ммоль/л) и насыщении карбогеном [3]. Эстрадиол в сыворотке крови и инкубатах надпочечников и яичников определяли радиоиммунным методом с использованием антисыворотки к эстрадиолу (фирма «Sigma», США), меченого эстрадиола (6,7-³H-эстрадиол, Ленинград) и стандартов намеченого эстрадиола (фирма «Sigma», США). Тестостерон определяли с помощью стандартного набора (Минск). Матку гомогенизировали в буфере трис-HCl (трис—20 ммоль/л, Хелатон — 1,5 ммоль/л, меркаптоэтанол — 1 ммоль/л, pH 7,4) в соотношении ткань—буфер, соответствующем 1:10. Гомогенат центрифугировали при 18 000 g. Концентрацию рецепторов устанавливали в полученном цитозоле по значению специфического связывания 6,7-³H-эстрадиола, которое определяли вычитанием неспецифического связывания эстрадиола (при наличии 1000-кратного избытка немеченого) из общего связывания. Связывание ³H-эстрадиола (10 нмоль/л) в пробе цитозоля объемом 0,1 мл проводили в течение 16—18 ч при температуре 4 °C. Несвязавшийся гормон удаляли суспензией «уголь — декстран» (0,25 %-ный уголь, 0,025 %-ный декстран, молекулярная масса — 60 тыс.—90 тыс.). Количественное определение белка проводили с помощью метода Бредфорда [6].

При сравнении средних значений использовали критерий *t* Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Содержание эстрадиола в сыворотке крови в утренние часы практически не различалось в обеих экспериментальных группах (рис. 1). В вечернее время в контрольной группе наблюдали достоверное снижение концентрации эстрогена, тогда как в опытной изменения не произошло, причем разница между группами стала достоверной. При этом продукция эстрадиола надпочечниками и яичниками *in vitro* не изменялась в течение дня и не различалась в обеих экспериментальных группах (рис. 2). Сходную картину наблюдали и при исследовании *in vitro* продукции предшественника эстрадиола — тестостерона. Таким образом, на основании результатов, полученных *in vitro*, нельзя утверждать, что снижение содержания эстрадиола в циркулирующей крови контрольных животных обусловлено изменением его секреции из желез.

Данное снижение можно было бы объяснить изменением рецепции гормона в ткани-мишени. Несложные расчеты показывают, что емкость специфических эстрадиолсвязывающих мест в матке сопоставима с общим содержанием эстрогенов в периферической крови. В данном исследовании матку одной крысы гомогенизировали в 0,4 мл буфера, а связывание меченого эстрадиола проводили в пробе цитозоля объемом 0,1 мл, содержавшей около 250 мкг белка. Как видно из рис. 2, в этих условиях специфически связывалось примерно 200 фмоль эстрадиола на 250 мкг белка. При пересчете на всю матку оказывается, что связывающая емкость ее водорастворимой части составляет 800 фмоль (около 1 пмоля, или 272 пг эстрадиола). У крысы 30-суточного возраста (масса около 60 г) объем крови примерно составляет 3 мл, и, значит, суммарная масса циркулирующего эстрадиола — $90 \cdot 3$, т. е. 270 пг (90 пг/мл — это значение концентрации эстрадиола для сыворотки). Из данных оценочных расчетов видно, что рецепция гормона может существенно повлиять на динамику его содержания в крови. Однако в настоящем исследовании концентрация цитозольных рецепторов эстрадиола в обеих экспериментальных группах не изменялась в течение

дня. Таким образом, нельзя утверждать также, что различие динамики содержания эстрадиола в крови между контрольными и опытными животными обусловлено различиями рецепции гормона в ткани-мишени. В данном случае остается предположить, что существенную роль в вечернем снижении концентрации эстрадиола в сыворотке крови контрольных животных могут играть центральные (гипоталамо-гипофизарные) звенья, регулирующие секрецию гормона *in vivo*, и изменение транспорта и метаболизма эстрогенов.

Следует отметить, что надпочечники и яичники *in vitro* продуцировали в 20–25 раз больше тестостерона, чем эстрадиола. Аналогичный

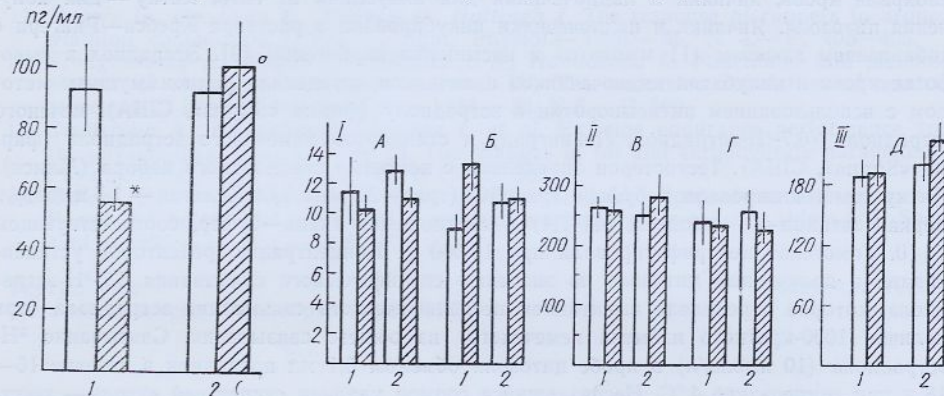


Рис. 1. Концентрация эстрадиола (пг/мл) в сыворотке крови:

1 — контрольные животные, 2 — опытные. Светлые столбики — утро (9.30–10.30), заштрихованные — вечер (16.30–17.30). Звездочкой обозначена достоверность различия между утром и вечером ($P < 0.05$), кружочком — между опытной и контрольной группами ($P < 0.05$).

Рис. 2. Продукция *in vitro* эстрадиола надпочечниками (А) и яичниками (Б), тестостерона надпочечниками (В) и яичниками (Г), рецепция эстрадиола в цитозоле матки (Д). По оси ординат: I — пг/2 железы·ч⁻¹, II — пг/2 железы·ч⁻¹, III — фмоль/250 мкг белка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

результат описан для условий *in vivo*: концентрация тестостерона в крови у самок крыс в зависимости от фазы эстрального цикла до 50 раз превышала таковую эстрадиола [9].

Повышенное содержание эстрадиола в вечерние часы у опытных животных хорошо объясняет ряд феноменов, описанных ранее при подобных воздействиях: задержку полового созревания [5, 7], маскулинизацию [19], постоянную течку [21]. Известно, что хроническое повышение концентрации эстрадиола может приводить к подавлению секреции фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [11, 20] и таким образом препятствовать развитию фолликулов [20]. У неполовозрелых животных данная цепь событий приведет к задержке наступления половой зрелости. В наступлении половой зрелости важное значение имеет пульсативная секреция ЛГ [24], которая в опытной группе вследствие постоянного высокого содержания эстрадиола может нарушаться.

Введение эстрогенов самкам крыс в раннем онтогенезе вызывает резко их маскулинизацию [8]. Возможно, что избыток эстрогенов и в препубертатный период обладает маскулинизирующим влиянием, т. е. именно он может опосредовать маскулинизирующие эффекты воздействия кортизолом в раннем онтогенезе [19]. К маскулинизирующим эффектам относят и постоянную течку, наблюдаемую у крыс после введения им кортикостерона в первую неделю постнатальной жизни [21], причиной которой может быть хроническое повышение содержания эстрадиола [2].

Таким образом, результаты наших исследований показали, что неонатальное введение кортизола вызывает повышение содержания эстрадиола в крови 30-суточных самок крыс в вечернее время. Обнаруженная гиперэстрогенизация у опытных животных хорошо согласуется с теми эффектами, которые описывают у неонатально инъецированных глюкокортикоидами крыс.

THE CORTISOL EFFECT ON ESTRADIOL SECRETION AND RECEPTION IN MORNING AND EVENING HOURS IN THE RAT FEMALES AGED 30 DAYS

A. A. Tinnikov

Cortisol administration (250 µg) to 5-day-old female rats was studied for its effect on the diurnal (morning-evening) rhythm of the estradiol secretion and reception on the 30th day of life. This stimulus had no influence on the estradiol level in the morning time. In the evening the estrogen concentration in the control group decreased while in the cortisol-treated group there were no changes. Disturbance of the circadian periodicity in the serum estradiol concentration in cortisol-treated animals was not induced by changes in the secretory ability of adrenals and ovaries, which was estimated by measurement of the estradiol production by glands in vitro. This disturbance was not a result of changes in hormone reception in uterine cytosol. The increased estradiol level in cortisol-treated rats in the evening is in good agreement with effects caused by neonatal glucocorticoid treatment in the reproductive system.

Institute of Cytology and Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Siberian Branch, Novosibirsk

1. Бабичев В. И. Нейроэндокринология пола.— М.: Наука, 1981.— 224 с.
2. Вундер П. А., Сметанина М. Д. Постоянный эструс как форма нарушения полового цикла. Механизм и условия, влияющие на его становление // Успехи соврем. биологии.— 1987.— 103, вып. 1.— С. 133—141.
3. Механизмы сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих / Под ред. Колпакова М. Г.— Новосибирск: Наука, 1974.— 160 с.
4. Смирнов А. Н., Смирнова О. В., Сенаторова Т. А., Розен В. Б. Влияние эстрогенов на концентрацию рецепторов к эстрадиолу в матке, почке и печени крыс // Пробл. эндокринологии.— 1975.— 21, № 6.— С. 73—78.
5. Тинников А. А., Бажан Н. М. Влияние гидрокортизона на постнатальный онтогенез продукции и рецепции эстрадиола у крыс // Вопросы эволюционной физиологии.— Л., 1986.— С. 280—281.
6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.— 1976.— 72, N 1.— P. 248—254.
7. Cost M. G., Mann D. R. Neonatal corticoid administration: retardation of adrenal rhythmicity and desynchronization of puberty // Life Sci.— 1976.— 19.— P. 1929—1936.
8. Dorner G. Sexual brain differentiation in animals and human beings // Hum. Reprod.— 1986.— 1, suppl. 2.— P. 6—7.
9. Dupon C., Kim M. H. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestrous cycle // J. Endocrinol.— 1973.— 59, N 3.— P. 653—654.
10. Gorsky-Firlit M., Lawton J. E. The timing of the adrenal-ovarian interaction period in the prepubertal rat // Biol. Reprod.— 1974.— 11, N 4.— P. 413—420.
11. Huang E. S., Miller W. L. Effect of 17β-estradiol on basal and luteinizing hormone-releasing hormone-induced secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by ovine pituitary cell culture // Biol. Reprod.— 1980.— 23, N 1.— P. 124—134.
12. Krieger D. T. Effect of neonatal hydrocortisone on corticosteroid circadian periodicity, responsiveness to ACTH and stress in prepubertal and adult rats // Neuroendocrinology.— 1974.— 16, N 4.— P. 355—369.
13. Leavitt W. W. Hormonal regulation of myometrial estrogen, progesterone, and oxytocin receptors in the pregnant and pseudopregnant hamster // Endocrinology.— 1985.— 116, N 3.— P. 1079—1084.
14. Mann D. R., Braverman M., Cohen J., Cost M. Neonatal glucocorticoid administration: effect on the diurnal rhythm of serum concentrations of corticosterone, progesterone and LH, and the response to pregnant mare serum gonadotrophin in immature female rats // J. Endocrinology.— 1984.— 100, N 2.— P. 203—207.
15. Meys-Roelofs H. M. A., Uilenbroek J., de Jong F. Plasma oestradiol-17β and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats // J. Endocrinol.— 1973.— 59, N 2.— P. 295—304.
16. Morera A. M., Audi L., Bertrand J., Saez J. M. Estrogen-like compounds and progesterone in male and female rats before puberty. 1. Pattern and origin // J. Steroid Biochem.— 1978.— 9, N 7.— P. 623—629.
17. Purrot R. G., Sage M. The assay of ACTH and the action of ACTH and steroids on corticosteroidogenesis in the mouse // Pflugers Arch.— 1969.— 309, N 2.— P. 107—114.
18. Ramaley J. A. The adrenal rhythm and puberty onset in the female rat // Life Sci.— 1978.— 23, N 21.— P. 2079—2088.
19. Roland H., Reinboth R., Neuman F. Einfluss von glucocorticosteroiden auf die geschlechtsdifferenzierung von ratten // Endocrinologie.— 1977.— 69.— S. 181—194.

20. Speroff T., Glass R. H., Kass N. C. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.— Baltimore: Williams and Wilkins, 1973.— 130 p.
21. Turner B. B., Taylor A. N. Effects of postnatal corticosterone treatment on reproductive development in the rat // J. Reprod. Fert.— 1977.— 51, N 2.— P. 309—314.
22. Ulrich R., Yuwiler A., Geller E. Neonatal hydrocortisone: Effects on the development of the stress response and the diurnal rhythm of corticosterone // Neuroendocrinology.— 1976.— 21, N 1.— P. 49—57.
23. Weisz J., Gunsalus P. Estrogen levels in immature female rats: true or spurious — ovarian or adrenalé // Endocrinology.— 1973.— 93, N 5.— P. 1057—1065.
24. Zarale A. Regulacion neuroendocrina de la reproduccion. // Arch. invest. med.— 1985.— 16, Supl. N 3.— P. 5—10.

Институт цитологии и генетики
АН СССР, Сиб. отд-ние, Новосибирск

Поступила 22.02.88

К сведению авторов

Множители и приставки СИ для образования десятичных кратных и дольных единиц

Множитель	Приставка СИ	Обозначение приставки		Множитель	Приставка СИ	Обозначение приставки	
		международное	русское			международное	русское
10^{18}	экса	E	Э	10^{-1}	деци	d	д
10^{15}	пета	P	П	10^{-2}	санتي	c	с
10^{12}	тера	T	Т	10^{-3}	милли	m	м
10^9	гига	G	Г	10^{-6}	микро	μ	МК
10^6	мега	M	М	10^{-9}	нано	p	н
10^3	кило	k	к	10^{-12}	пико	p	п
10^2	гекто	h	г	10^{-15}	фемто	f	ф
10^1	дека	da	да	10^{-18}	атто	a	а