

О.І.Ковзун

Вивчення впливу оварієктомії та естрадіолу на метаболізм ДНК, РНК і білка в корі надниркових залоз щурів

Изучали влияние овариектомии и эстрадиола на включение специфических предшественников в ДНК, РНК и белок. Овариектомия вызывала уменьшение массы надпочечников наряду с увеличением содержания ДНК, в особенности через 8 нед после овариектомии. Результатом трехсуточного введения эстрадиола кастрированным животным было усиление включения [³H]-тимидина, [³H]-уридина и [³H]-лейцина в ДНК, РНК и белок соответственно. Более интенсивное включение метки наблюдалось у животных, взятых в эксперимент через 8 нед после овариектомии. При введении эстрадиола интактным животным изменение включения специфических предшественников в ДНК, РНК и белок не установлено. Полученные результаты свидетельствуют, что эстрадиол оказывает анаболическое действие на метаболизм ДНК, РНК и белка в коре надпочечников овариектомизированных крыс.

Вступ

Добре відомо, що надниркові залози самок деяких видів тварин більші за надниркові залози самців, і що кастрація самок спричиняє зменшення маси залоз, кастрація самців — збільшення, а замісна терапія естрогенами або андрогенами компенсує ефекти оварієктомії та орхієктомії відповідно [11]. Атрофія надниркових залоз внаслідок оварієктомії, в першу чергу, пов'язана зі зменшенням об'єму адренкортикоцитів [11, 13]. Наслідки кастрації проявляються здебільшого в пучковій та сітчастій зонах кори [11, 13]. Проте довготривале введення естрогенів у дозах, що значно перевищують фізіологічні, може викликати збільшення кількості клітин кори надниркових залоз у цих зонах [9].

Функція надниркових залоз також залежить від концентрації естрогенів. Оварієктомія призводить до різкого зниження продукції кортикостероїдів, а введення естрогенів чинить стимулюючий ефект на стероїдогенез у щурів [10, 12]. Проте в цілому механізм регуляції естрогенами функції кори надниркових залоз залишається нез'ясованим. З одного боку, дія естрогенів на кору надниркових залоз може бути прямою. Про це свідчить наявність рецепторів естрогенів у корі надниркових залоз щурів [7], а також збільшення синтезу кортикостероїдів під впливом естрогенів *in vitro* [3]. З іншого боку, можливий опосередкований вплив естрогенів через гіпоталамус і гіпофіз. Після оварієктомії знижується синтез АКТГ гіпофізом і зменшується концентрація кортикостерону в крові, а замісне введення естрадіолу відновлює рівень кортикотропіну і кортикостерону до контрольних значень [5, 6, 8, 14].

Проте біохімічні процеси, що лежать в основі таких змін, недостатньо досліджені. Тому метою нашої роботи було дослідити ефекти різних строків оварієктомії і вплив естрадіолу *in vivo* у оварієктомованих та інтактних щурів на основні анаболічні процеси: мічення ДНК, РНК і білка специфічними попередниками.

Методика

Досліди проводили на самках щурів лінії Вістар масою 150—200 г. Двосторонню оварієктомію здійснювали під ефірним наркозом. Стан репродуктивних органів контролювали дослідженням епітелію піхви під мікроскопом. Використовували такі експериментальні групи: інтактні тварини, яким вводили сливову олію; інтактні тварини, яким вводили внутрішньом'язово естрадіол; псевдооперовані тварини; оварієктомовані тварини; оварієктомовані, що отримували естрадіол (естрадіол бензоат фірми «Koch-Light», Англія, розчинений в сливовій олії, у дозі 50 мкг/на тварину протягом трьох діб). В експериментах тварин використовували через 2 і 8 тиж після кастрації. Оскільки між псевдооперованими тваринами та інтактними, які отримували олію, не спостерігали вірогідних змін ні з одного з досліджуваних параметрів, вони були об'єднані в одну групу контрольних тварин. З того ж приводу групи оварієктомованих тварин та оварієктомованих, яких ін'єкували олією, були об'єднані в групу оварієктомованих тварин. Тварин декапітували через 24 год після останньої ін'єкції.

Надниркові залози видалляли і зважували. Зрізи кори (масою 10—20 мг, товщиною близько 0,5 мм) промивали охолодженим середовищем 199 (Інститут поліомієліту, Росія) і переводили в свіжу порцію цього ж середовища, що додатково містило 0,2 % сироваткового альбуміну великої рогатої худоби фірми «Serva» (Німеччина) і 10 ммоль/л NEPES фірми «Calbiochem» (США), а також одну з міток: (185 кБк/мл) [³H]-тимідину, [³H]-уридину, [³H]-лейцину фірми «Ізотоп» (Росія). Проби інкубували протягом 60 хв при 37 °С та постійному струшуванні. Інкубацію припиняли переміщенням проб у льодову баню. Радиоактивне середовище видалляли і зрізи гомогенізували в охолоджену буфері 20 ммоль/л *tris*-HCl, рН 7,5, що містив 250 ммоль/л сахарози фірми «BioRad» (США), 2 ммоль/л EDTA фірми «Serva» (США), 0,5 ммоль/л EGTA фірми «Serva» (США), 10 ммоль/л 2-меркаптоетанолу фірми «BioRad» (США), 1 ммоль/л фенілметилсульфонілфториду фірми «Serva» (США), 100 мг/л гепарину фірми «Гедон-Ріхтер» (Угорщина).

Білки та нуклеїнові кислоти осаджували 5 %-ю трихлороцтовою кислотою (ТХО), осад переносили на скляні фільтри GF/C фірми «Whatman» (Англія), промивали 5 %-ю ТХО (15—20 мл, 3—4 рази) і етанолом (8—10 мл, 3 рази). Радиоактивність фракцій визначали в рідинному скінтіляційному лічильнику Beckman LS 5000, кількість РНК і ДНК — згідно з методичними рекомендаціями Трудолюбової [2], кількість білка — за Bradford [4]. При обробці результатів використовували комп'ютерну програму SIGMAPLOT. Вірогідність змін підтверджували за допомогою непараметричного U-тесту Вілкоксона—Манна—Уїтні та критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

Через 8 тиж після оварієктомії у щурів спостерігали зниження маси надниркових залоз і відношення маси залоз до маси тіла (таблиця). Такі зміни виникали не раніше двох тижнів після операції. В обох групах оварієктомія викликала дворазове збільшення вмісту ДНК у розрахунку на білок, але в розрахунку на орган кількість ДНК не змінювалася. Це дозволяє припустити зниження вмісту білка в тканині, що може

Вплив оварієктомії та ест

Умова досліджу	Кількість спостережень	М
До оварієктомії:		
контроль	12	
введення естрадіолу	9	
Після оварієктомії:		
через 2 тиж		
контроль	12	
введення естрадіолу	6	51
Після оварієктомії:		
через 8 тиж		
контроль	12	39
введення естрадіолу	3	3

*, ** — вірогідний вплив
****, *** — вірогідний вплив

призвести до зниження результату тривалості життя шляхом збільшення об'єму клітин.

Введення естрадіолу оварієктомії, викликало збільшення об'єму клітин поряд зі збільшенням маси. Через 8 тиж до експерименту відновлення контрольних тварин оварієктомії викликало збільшення об'єму клітин тиж після кастрації спостерігали збільшення залоз у результаті трихлороцтової оварієктомії введення естрадіолу.

Додатковим підтвердженням впливу естрадіолу внаслідок кастрації, збільшення цього параметру в оварієктомованих тваринах. При введенні естрадіолу розглядалися, не змінивши об'єму клітин, зменшення метаболічних процесів внаслідок оварієктомії введення естрадіолу узгоджують з даними інших авторів [9, 11, 13].

Аналіз змін синтезу білка в надниркових залоз оварієктомії

Вплив оварієктомії та естрадіолу на масу надниркових залоз і вміст ДНК (M±m)

Умова досліджу	Кількість спостережень	Маса надниркових залоз, мг	Індекс: маса залоз/маса тіла, мг/100 г	Вміст ДНК, мкг		РНК/ДНК
				на мг білка	на надниркову залозу	
До оварієктомії:						
контроль	12	48,0±2,3	24,4±1,0	64,6±2,4	123,4±9,9	1,30±0,12
введення естрадіолу	9	54,9±3,8	26,6±19,1	62,9±5,9	129,7±14,8	1,47±0,15
Після оварієктомії:						
через 2 тиж						
контроль	12	51,3±1,1	25,3±0,5	117,0±15,2***	136,5±8,3	1,05±0,06****
введення естрадіолу	6	58,7±2,4**	29,1±1,0**	62,7±8,0**	146,5±12,8	1,40±0,13*
Після оварієктомії:						
через 8 тиж						
контроль	12	39,3±2,8***	19,4±1,1***	131,7±13,1***	121,2±12,7	1,47±0,09
введення естрадіолу	3	37,3±1,3	16,2±0,1	134,9±17,8	112,2±11,6	1,72±0,23

** — вірогідний вплив естрадіолу з P<0,05; P<0,01

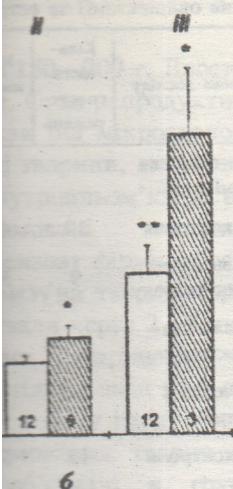
****, *** — вірогідний вплив оварієктомії з P<0,05; P<0,01.

привести до зниження маси залоз через 8 тиж. Ймовірно, такі зміни є результатом тривалої нестачі естрогенів в організмі й зумовлені зменшенням об'єму клітин і гіпотрофією тканини.

Введення естрадіолу тваринам, що взяті в експеримент через 2 тиж після оварієктомії, викликало зменшення кількості ДНК до контрольних значень поряд зі збільшенням маси надниркових залоз. У тварин, оварієктомованих за 8 тиж до експерименту, тридобових ін'єкцій естрадіолу було недостатньо для відновлення контрольного рівня ДНК. Таким чином, 2- і 8-тижневі строки оварієктомії викликають різний ступінь атрофії надниркових залоз. Через 2 тиж після кастрації спостерігається відновлення вихідного стану надниркових залоз у результаті тридобової замісної терапії естрадіолом. Через 8 тиж після оварієктомії введення естрадіолу протягом 3 діб уже неєфективне.

Додатковим підтвердженням гіпотрофії надниркових залоз, що настає внаслідок кастрації, може бути зменшення відношення РНК/ДНК. Збільшення цього відношення при замісному введенні естрадіолу оварієктомованим тваринам свідчить про посилення процесів синтезу. При введенні естрадіолу інтактним тваринам жоден з параметрів, що розглядалися, не змінювався (див. таблицю). Наші результати щодо виникнення метаболічних ознак гіпотрофії тканини кори надниркових залоз внаслідок оварієктомії і відновлення вихідного стану при введенні естрадіолу узгоджуються з морфологічними спостереженнями інших авторів [9, 11, 13].

Аналіз змін синтетичних процесів проведено *in vitro* на тканині надниркових залоз оварієктомованих щурів. Як видно з рисунку (а), включення



жків після овариєктомії (I — 2 тиж, III — 8 тиж) і ІІ (I — без введення естрадіолу в дозі 50 мкг/тварин на включення [³H]-уридину (6) та [³H]-нуклеотидозв'язану фракцію надниркових залоз шурів. Режими вказано всередині графіка. Ординат розпадає за 1 хв маси × 10⁻³. *P<0,05 (вплив естрадіолу), **P<0,05 (вплив овариєктомії), #P<0,05 (вплив естрадіолу).

збільшується через 2 тиж після овариєктомії. Під впливом естрадіолу у тварин спостерігалось

збільшення за 2 тиж до овариєктомії тваринами (див. рисунок). Під впливом естрадіолу спостерігалось істотне посилення синтезу білка, тому що маса надниркових залоз у цих тварин не збільшується, а коефіцієнт ДНК/білок підвищується, очевидно, внаслідок зменшення рівня білка в тканині (див. таблицю). У тварин, що використовувалися в досліді через 2 тиж після овариєктомії, естрадіол не впливав на включення [³H]-лейцину в білки. Через 8 тиж після овариєктомії під впливом естрадіолу спостерігалось значне посилення включення міченого лейцину. Після введення естрадіолу інтактним тваринам не відбувалося статистично вірогідних змін включення [³H]-тимідину, [³H]-уридину, [³H]-лейцину.

Після введення естрадіолу інтактним тваринам не відбувалося статистично вірогідних змін включення міченого лейцину. Після введення естрадіолу інтактним тваринам не відбувалося статистично вірогідних змін включення [³H]-тимідину, [³H]-уридину, [³H]-лейцину.

Певне, при цьому пригнічувався синтез ендogenous естрадіолу за принципом зворотного зв'язку і рівень гормону в крові залишався незмінним.

операції (див. рисунок, в). Ми схильні вважати це наслідком зменшення пулу попередників синтезу білка, тому що маса надниркових залоз у цих тварин не збільшується, а коефіцієнт ДНК/білок підвищується, очевидно, внаслідок зменшення рівня білка в тканині (див. таблицю). У тварин, що використовувалися в досліді через 2 тиж після овариєктомії, естрадіол не впливав на включення [³H]-лейцину в білки. Через 8 тиж після овариєктомії під впливом естрадіолу спостерігалось значне посилення включення міченого лейцину. Після введення естрадіолу інтактним тваринам не відбувалося статистично вірогідних змін включення [³H]-тимідину, [³H]-уридину, [³H]-лейцину.

Таким чином, тридобове введення естрадіолу викликає виражену анаболічну дію на метаболізм ДНК, РНК і білка, особливо чітко виражену при тривалих строках овариєктомії. Зі збільшенням строку після овариєктомії чутливість надниркових залоз до естрадіолу збільшується. Підвищення синтезу ДНК під впливом естрадіолу *in vivo* продемонстровано також на ізольованих ядрах печінки [1]. Здається, саме здатність естрадіолу до стимуляції біосинтезу нуклеїнових кислот і білків зумовлює відновлення маси надниркових залоз та їх морфологічних характеристик при замісній гормонотерапії естрогенами у овариєктомованих тварин [9, 11]. Цікаво, що ми не спостерігали подібної стимуляції анаболізму ДНК, РНК і білка при введенні естрадіолу інтактним тваринам. Певне, при цьому пригнічувався синтез ендogenous естрадіолу за принципом зворотного зв'язку і рівень гормону в крові залишався незмінним.

H.I. Kovzun

EFFECT OVARIECTOMY AND OESTRADIOL ON METABOLISM OF DNA, RNA AND PROTEIN IN THE RAT ADRENAL CORTEX

The effects of ovariectomy and oestradiol on incorporation of specific labelled precursors into DNA, RNA and protein were studied. Ovariectomy caused a decrease in the adrenal weight as well as an increase in the DNA content. That effect has been demonstrated most clearly 8 weeks after ovariectomy. Oestradiol treatment of ovariectomized rats during 3 days resulted in an increase of incorporation of [³H]-thymidine, [³H]-uridine and [³H]-leucine into DNA, RNA and protein, respectively. Higher rates of the label incorporation into the tissue from animals taken into experiment 8 weeks after ovariectomy were observed. Significant changes in incorporation of the specific precursors into DNA, RNA and protein were absent in the case of oestradiol treatment of intact rats. These data demonstrate that oestradiol have an anabolic effect on metabolism of DNA, RNA and protein in the adrenal cortex of ovariectomized rats.

V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Димитров О.А., Кабанькова С.Д., Николов Й.Т., Иванова В.Л., Москова В.В. Влияние эстрадиола на синтез ДНК в печени самок крыс // Пробл. эндокринологии. — 1987. — № 5. — С. 56—59.
2. Трудовой М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных. — В кн.: Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 313—316.
3. Юдаев Н.А., Микоша А.С. Влияние эстрогена на биосинтез гидрокортизона надпочечниками морской свинки *in vitro* // Биохимия. — 1963. — № 3. — С. 462—466.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
5. Burgess L.H., Handa R.J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in the female rats // Endocrinology. — 1992. — 131. — P. 1261—1269.
6. Coyne M.D., Kitay J.J. Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH // Ibid. — 1969. — 86. — P. 1097—1102.

7. Cutler G.B.Jr, Barnes K.M., Sauer M.A., Loriaux L. Estrogen receptor in rat adrenal gland // *Ibid.* — 1978. — 102. — P. 252—257.
8. Lesniewska B., Nowak M., Malendowicz L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVIII. ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized and gonadal hormone replaced rats // *Hormone and Metab. Res.* — 1990. — 22. — P. 378—381.
9. Malendowicz L.K. Stereological studies on the effects of pinealectomy, melatonin and oestradiol on the adrenal cortex of ovariectomized rats // *J. Anat.* — 1985. — 141. — P. 115—120.
10. Malendowicz L.K., Majchrzak M., Nowak M. Estradiol and melatonin effects on adrenal cortex of ovariectomized and pinealectomized rats // *Exp. Clin. Endocrinol.* — 1985. — 85, № 3. — P. 276—282.
11. Malendowicz L.K., Robba C., Nussdorfer G.G. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXII. Light- and electron- microscopic morphometric studies on the effects of gonadectomy and gonadal hormone replacement on the rat adrenal cortex // *Cell Tissue Res.* — 1986. — 244. — P. 141—145.
12. Mandal S., Tripathi S.K., Beotra A., Sanyal A.K. Effect of stilbestrol on adrenal steroidogenesis in albino rats // *Indian. J. Exp. Biol.* — 1985. — 23. — P. 27—30.
13. Stachowiak A., Nussdorfer G.G., Malendowicz L.K. Ovariectomy — induced changes in the adrenal cortex of spontaneously hypertensive rats // *Histol. Histopath.* — 1991. — 6. — P. 257—259.
14. Viau V., Meaney M.J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat // *Endocrinology.* — 1991. — 129. — P. 2503—2511.

Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім. В.П.Комісаренка АМН України

Матеріал надійшов
до редакції 08.12.93

УДК 612.8

О.П.Никоненко

Порівняльний аналіз антропометричних процесів у юнаків

Проводили дослідження антропометричних процесів в умовах зростаючих вікових груп. В результаті сопоставлення показників антропометричних процесів між указаними групами в період між антропометричними фазовими стадіями нервової системи пубертатного віку (16—17 лет) оцінювали ступінь приближення

Вступ

Нині вивчення форм антропометричних процесів різних вікових періодів на основі морфофункціональних показників та їх можливостей везу людини. Комплексна робота диференційного аналізу, який поєднує функціональну готовність окремих вікових груп.

У вітчизняній літературі [10, 13, 14]. На фоні порівняння показників антропометричних процесів в певний період з такими показниками в інших періодах, які отримані в результаті нашої роботи будуть.

Методика

Обстежено чотири групи хлопчиків I група — хлопчики 14—15 років (пубертатний період), II група — хлопчики 15—17 років (другий період зростаючого віку), III група — хлопчики 18—21 року (період зростаючого віку), IV група — хлопчики 22—25 років (період зростаючого віку).

Вивчення параметрів антропометричних процесів проводили з використанням приладу ПНДО. Дослідження проводили за умов переробки об'єкта в першій сигнальній фазі.