

М.Д. Тронько, О.І. Ковзун, Є.М. Грінченко, О.С. Микоша

## Вплив естрадіолу на синтез кортикостероїдів, активність протеїнкіназ А та С у корі надниркових залоз інтактних та орхіектомованих щурів

*Введение эстрадиола бензоата приводит к увеличению содержания суммарных 11-гидроксикортикостероидов в плазме крови интактных и кастрированных крыс. Эстрадиол вызывает усиление активности протеинкиназы А в цитозольной и микросомальной фракциях адренкортикоцитов этих животных. Активность протеинкиназы С также увеличивается как в цитозольной, так и в микросомальной фракциях адренкортикоцитов. Полученные результаты свидетельствуют об участии цАМФ-зависимой протеинкиназы А и С в реализации эффектов эстрадиола в коре надпочечников.*

### ВСТУП

Функція кори надниркових залоз залежить від естрогенів, введення яких збільшує утворення кортикостероїдів [10, 14]. Синтез останніх активується безпосередньо естрогенами *in vitro* [3, 7], але в організмі може бути наслідком модуляції ефектів агоністів, зокрема через стимуляцію секреції адренокортикотропного гормону (АКТГ) [11]. Специфічне зв'язування АКТГ, міченого  $^{125}\text{I}$ , мікросомами кори надниркових залоз значно зменшується у оваріектомованих щурів, а введення естрадіолу збільшує зв'язування кортикотропіну до значень, котрі істотно перевищували контрольні [6]. Проте фізіологічна роль і молекулярні механізми участі естрогенів у регуляції функціонального стану кори надниркових залоз залишаються нез'ясованими.

Внаслідок внутрішньовенного введення похідного естрадіолу, міченого  $^{125}\text{I}$ , більша його частина акумулювалася в надниркових залозах, а значно менша – в матці та яєчниках [8]; крім того, очевидно, рецептори естрадіолу не беруть участі в процесі зв'язування. Відомо, що природні та син-

тетичні естрогени активно використовуються для лікування раку простати у чоловіків [15], тому дослідження ефектів естрадіолу на інтактних і кастрованих щурах-самцях можуть бути екстрапольовані на зміни функції надниркових залоз у людини.

Мета нашої роботи – дослідження дії естрадіолу бензоату *in vivo* на вміст сумарних 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові інтактних та орхіектомованих щурів і на активність протеїнкіназ А і С, які можуть брати участь у переносі сигналів естрогенів у адренкортикоцитах.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 72 дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–250 г. Орхіектомію здійснювали під ефірним наркозом. В експериментах тварин використовували через 4 тиж після кастрації. Щурів було поділено на 4 групи. До I групи ввійшли інтактні тварини, яким вводили сливову олію; до II – інтактні тварини, що отримували естрадіол (естрадіол бензоат «Koch-Light», Великобританія), розчинений

© М.Д. Тронько, О.І. Ковзун, Є.М. Грінченко, О.С. Микоша

у сливовій олії, у дозі на одну тварину 50 або 100 мкг протягом 3 діб. Орхієктомовані тварини склали III групу, до IV групи ввійшли орхієктомовані щури, що отримували естрадіол. Тварин декапітували під етаміналовим наркозом (4 мг/100 г) через добу після останньої ін'єкції. Відомо, що введення етаміналу не впливає на вміст 11-ОКС у плазмі крові. Кров кожної тварини збирали у пробірки з гепарином (ЗАТ «Індар», Україна), центрифугували при 2000 г 10 хв, в отриманій плазмі проводили кількісне визначення 11-ОКС [1]. Як стандарт використовували кортикостерон.

Надниркові залози видаляли, очищували на льоду від жиру та мозкової речовини. Зрізи кори надниркових залоз двох-трьох тварин подрібнювали у гомогенізаторі з тефлоновим товкачиком у 2–3 об'ємах охолодженого буфера, який містив: 0,25 моль/л сахарози, 25 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,4), 3 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 2 ммоль/л ЕГТА, 0,1 ммоль/л спермідину, 0,1% тритону X-100, 0,1 ммоль/л фенолметилсульфонілфториду. Гомогенат центрифугували при 10 000 г 10 хв для осадження ядер, дебрису та мітохондрій. Супернатант центрифугували при 100000 г 60 хв для отримання цитозольної фракції та осаду мікросом. Мікросоми суспендували у буфері, що містив 100 ммоль/л тріс-НСІ та 0,25 моль/л сахарози (рН 7,4). Фракції зберігали до використання при -60 °С.

Активність протеїнкіназ А і С визначали за описаною раніше методикою, що базується на зміні напрямку руху в агарозному гелі пептидних субстратів кемпиду (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, "Sigma",

США) і нейрограніну (Ala-Ala-Lys-Ile-Gln-Ala-Ser-Phe-Arg-Gly-His-Met-Ala-Arg-Lys-Lys, "Sigma", США) внаслідок фосфорилування протеїнкіназами [5]. Активність протеїнкіназ виражали у наномолях фосфорильованого субстрату за 1 хв на 1 мг білка.

Статистичну обробку результатів проводили за критеріями F Фішера і t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після 3 діб введення естрадіолу спостерігалось істотне збільшення вмісту сумарних 11-ОКС у плазмі крові як інтактних, так і орхієктомованих щурів (табл. 1). Показано, що введення інтактним тваринам 50 мкг естрадіолу призводить до збільшення цього показника у 1,5 раза порівняно з інтактними тваринами, що отримували ін'єкції олії, а 100 мкг – більше ніж удвічі. Подібний ефект спостерігався і у кастрованих тварин.

У контрольних орхієктомованих щурів (III група) вміст 11-ОКС був дещо нижчим, ніж у інтактних, яким вводили сливову олію. Збільшення концентрації кортикостероїдних гормонів під впливом естрадіолу було подібним в обох експериментальних групах. Виходячи з цих результатів можна стверджувати, що вміст тестостерону в організмі не має помітного впливу на зміни функції адренкортикальних клітин під впливом естрадіолу. Ні орхієктомія, ні замісне введення щурам тестостерону не призводили до змін концентрації вільного холестерину або його ефірів, які є попередниками синтезу кортикостероїдів [9].

Залежність стероїдогенезу від вмісту

**Таблиця 1. Вплив естрадіолу бензоату на вміст сумарних 11-гідроксикортикостероїдів (нмоль/л) у плазмі крові самців щурів (M ± m)**

Група тварин	Контроль	50 мкг	100 мкг
Інтактні	1132 ± 140 (n = 14)	1756 ± 171* (n = 16)	2351 ± 230** (n = 17)
Орхієктомовані	781 ± 55*** (n = 9)	1235 ± 96*** (n = 8)	1848 ± 190** (n = 8)

Примітка. Тут і в табл. 2 \*, \*\* різниця з контролем є вірогідною, P<0,05 і P<0,01 відповідно, \*\*\* різниця порівняно з інтактними тваринами, P<0,05.

естрогенів за умов *in vivo* та *in vitro* спостерігали також інші автори. Введення етинілестрадіолу призводило до збільшення концентрації кортикостерону у плазмі крові та корі надниркових залоз щурів [10]. У кастрованих самців щурів, що отримували ін'єкції 17 $\beta$ -естрадіолу (1 мг), збільшувалася концентрація кортикостерону і дез-оксикортикостерону у плазмі крові, а також активація 21-гідроксилази у мікросомах печінки [14]. Раніше ми спостерігали посилення синтезу 11-ОКС під впливом 17 $\beta$ -естрадіолу в культивованих клітинах надниркових залоз поросят [3]. На диспергованих адренкортикоцитах щурів з видаленими статевими залозами 17 $\beta$ -естрадіол *in vitro* здатний спричиняти підвищення базальної секреції кортикостерону [13]. При відсутності АКТГ естрадіол *in vitro* стимулював секрецію кортизолу на культивованих клітинах надниркових залоз, видалених у хворих з синдромом Іценка–Кушинга [7].

Оскільки найважливішими етапами переносу сигналу основного регулятора функції кори надниркових залоз, АКТГ, є активація аденілатциклази і цАМФ-залежної протеїнкінази А, ми досліджували вплив естрадіолу *in vivo* на активність протеїнкінази А у субклітинних фракціях кори надниркових залоз.

Раніше нами було продемонстровано збільшення кількості цАМФ у корі надниркових залоз людини за умов стимуляції тканини 17 $\beta$ -естрадіолом [2]. Ці дані

свідчать про можливу участь протеїнкінази А у посиленні регуляторного сигналу естрогенів у адренкортикальних клітинах, як це спостерігається при дії АКТГ.

Визначення активності протеїнкінази А в субклітинних фракціях показало, що естрадіолу бензоат активує цю кіназу (табл. 2). Тридобове його введення призводить до істотного підвищення активності протеїнкінази А як у цитозольній, так і у мікросомальній фракціях кори надниркових залоз інтактних і орхіектомованих щурів. Вірогідність змін була вищою у мікросомальній фракції.

Відомо, що протеїнкіназа А відіграє суттєву роль у найважливіших етапах стероїдогенезу: відщепленні бокового ланцюга холестерину цитохромом P450<sub>sc</sub>, активації білка StAR, транспорті вільного холестерину до внутрішньої мітохондріальної мембрани [4].

Вміст цАМФ у клітинах, стимульованих форсколіном або додаванням ізобутилметилксантину (інгібітор фосфодіестераз) у поєднанні з форсколіном, АКТГ або пролактинном, був вищим при виділенні клітин з надниркових залоз щурів, що отримували естрадіолу бензоат, у порівнянні з оваріектомованими щурами [12]. Таким чином, базуючись на одержаних нами результатах і літературних даних можна стверджувати про залучення цАМФ-залежної системи до перенесення сигналу естрадіолу в клітинах надниркових залоз.

Ми визначали також активність протеїнкінази С, яка може брати участь в опосеред-

**Таблиця 2.** Вплив естрадіолу бензоату на активність протеїнкіназ А і С (нмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) у субклітинних фракціях клітин кори надниркових залоз самців щурів (M ± m)

Групи тварин, фракція	Контроль	Дослід		Контроль	Дослід	
		50 мкг	100 мкг		50 мкг	100 мкг
Протеїнкіназа А						
Цитозольна фракція						
Інтактні (n = 6)	3,96 ± 0,81	5,23 ± 0,83	8,41 ± 1,71*	8,42 ± 0,85	9,79 ± 1,41	16,62 ± 0,48**
Орхіектомовані (n = 4)	6,10 ± 1,31	6,93 ± 1,36	11,14 ± 1,21*	11,02 ± 0,31***	13,10 ± 0,43***	18,20 ± 0,77**
Протеїнкіназа С						
Мікросомальна фракція						
Інтактні (n = 6)	6,65 ± 0,81	8,90 ± 0,85	10,30 ± 1,90*	5,76 ± 0,75	9,56 ± 1,05	10,07 ± 1,24**
Орхіектомовані (n = 4)	3,08 ± 0,40***	6,16 ± 0,49***	8,65 ± 0,41**	6,86 ± 0,29	10,91 ± 0,20	13,84 ± 0,31**,**

куванні регуляторних сигналів естрогенів в адренокортикоцитах (див. табл. 2). Найбільша активність ферменту спостерігається при введенні максимальної кількості естрадіолу – 100 мкг. Активність протеїнкінази С вірогідно збільшується як у цитозольній фракції адренокортикоцитів, так і ще більшою мірою в мікосомальній фракції кори надниркових залоз інтактних і орхієктомованих щурів, що отримували естрадіол. Відомо, що накопичення цього ферменту саме в мембранній фракції (його транслокація) свідчить про його активацію.

Естрадіол підвищує активність протеїнкінази С у мікосомальній фракції кори надниркових залоз у 1,7 раза в групі інтактних тварин та у 2 рази в групі орхієктомованих тварин. За нашими результатами, естрадіол також активує *in vitro* протеїнкінази А і С в адренокортикальній тканині людини (не показано). Зміни вмісту кортикостероїдів і активності цих ферментів під впливом естрадіолу бензоату є подібними у інтактних і кастрованих самців щурів, що дає змогу зробити висновок: видалення сім'яників не впливає на відповідь надниркових залоз на естрогени.

Таким чином, отримані результати дозволяють вважати, що збільшення синтезу кортикостероїдів та активація протеїнкінази А і С у субклітинних фракціях адренокортикоцитів інтактних та орхієктомованих щурів внаслідок дії естрадіолу свідчить про причетність естрогенів до регуляції функції кори надниркових залоз і про залучення протеїнкінази до переносу регуляторного сигналу естрадіолу в адренокортикальних клітинах.

**M.D. Tronko, O.I. Kovzun, E.N. Grinchenko,  
A.S. Mikosha**

#### **EFFECTS OF ESTRADIOL ON CORTICOSTEROIDS SYNTHESIS, ACTIVITY OF PROTEIN KINASE A AND C IN THE ADRENAL CORTEX OF INTACT AND ORCHIECTOMIZED RATS**

Estradiol treatment produced significant increase of total 11-

hydroxycorticosteroids level in the blood of intact and castrated rats. Activity of protein kinase A increased in the cytosol and membrane fraction of adrenocorticytes of intact and orchietomized rats after estradiol influence. Activity of protein kinase C significantly raised in the cytosol and membrane fraction of adrenocortical cells in all investigated groups. Our results suggest that cAMP-dependent protein kinase A and protein kinase C mediate estradiol effects in adrenal cortex.

*V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kyiv, Ukraine.*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. - 1990. - **76**, № 2. - С. 280283.
2. Ковзун О.І. Участь циклічного АМФ в перенесенні регуляторних сигналів естрогенів у пухлинах надниркових залоз людини // Буковин. мед. вісник. - 2005. - **9**, № 2. - С. 123-125.
3. Микоша А.С., Ковзун Е.І., Грінченко Е.Н. Эстрадиол-17 $\beta$  активует образование кортикостероидов и тормозит пролиферацию культивируемых клеток надпочечников свиней // Укр. біохім. журн. - 2003. - **75**, № 1. - С. 29-32.
4. Микоша А.С., Тронько Н.Д. Участие протеинкиназных и фосфатазных реакций в переносе сигналов агонистов в клетках коры надпочечных желез // Успехи совр. биологии. - 2004. - **124**, № 4. - С. 362-370.
5. Пушкарьов В.М., Ковзун О.І., Тронько М.Д. и др. Участь фосфоінозитидів, протеїнкінази С та А у передачі регуляторного сигналу К<sup>+</sup> в адренокортикальних клітинах людини // Укр. біохім. журн. - 2005. - **77**, № 1. - С. 65-71.
6. Саутін Ю.Ю., Ковзун О.І., Тронько М.Д., Микоша О.С. Стимуляція пролактином та естрогенами рецепторів АКТГ // Ендокринологія. - 1996. - **1**, № 2. - С. 14-19.
7. Caticha O., Odell W.D., Wilson D.E. et al. Estradiol stimulates cortisol production by adrenal cells in estrogen-dependent primary adrenocortical dysplasia // J. Clin. Endocrinol. - 1993. - **77**, № 2. - P. 494-497.
8. Da Silva J.N., van Lier J.E. In vivo evaluation of 7 alpha-[11-(4-[125I]iodophenoxy)undecyl]-17beta-estradiol: a potential vector for therapy of adrenal and estrogen receptor-positive cancers // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. - 1990. - **37**, № 1. - P. 77-83.
9. Duda T., Waliszewska A., Trzeciak W.H., Malendowicz L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. XX. The effects of gonadectomy and testosterone or estradiol replacement on cholesterol content and distribution in the gland // J. Steroid Biochem. - 1985. - **23**, № 5A. - P. 577-581.
10. Flack J.D. The actions of ethinyloestradiol on the pituitary-adrenal system of the rat // Brit. J. Pharmacol. - 1970. - **38**. - P. 321-331.

11. 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 // Horm. Metab. Res. - 1990. - **22**. - P. 378-381.
12. Lo M.J., Chang L.L., Wang P.S. Effects of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats // J. Cell. Biochem. - 2000. - **77**, № 4. - P. 560-568.
13. Nowak K.W., Neri G., Nussdorfer G.G., Malendowicz L.K. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex // Life Sci. 1995. - **57**, № 9. - P. 833-837.
14. Natsume H., Endoh A., Nakagawa Y., Igarashi Y. Regulation of steroid 21-hydroxylation by 17 beta-estradiol in rat liver: in vivo and in vitro study // Endocrinol. J. - 1993. - **40**, № 2. - P. 197-206.
15. Tammela T. Endocrine treatment of prostate cancer // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. - 2004. - **92**, № 4. - P. 287-295.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П.  
Комісаренка АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 08.06.2006*