

ОСТРОЕ ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ ЛЮЛИБЕРИНА НА ГИПОФИЗАРНУЮ, ТЕСТИКУЛЯРНУЮ И ОВАРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ У ОБЕЗЬЯН

Лаборатория биологического контроля (зав. — доктор мед. наук Р. И. Крылова) Института медицинской приматологии (дир. — акад. РАН Б. А. Лапин) РАН, Сочи

Пульсаторное введение низких доз люлиберина (ЛГРФ) и агонистов ЛГРФ (аЛГРФ) для лечения гипоталамического гипогонадотропного гипогонадизма свидетельствует об очевидном его преимуществе перед заместительной терапией гонадотропинами [6, 10, 12]. Обнадёживающие результаты получены и при использовании стимулирующего влияния аЛГРФ на гипофизарно-гонадальную ось для ранней диагностики пубертатных расстройств [7, 9], лечения некоторых форм задержки полового созревания и крипторхизма [6], а также для индукции овуляции в программах фертилизации *in vitro* [5, 11]. Тем не менее результаты большинства клинических исследований свидетельствуют о недостаточной эффективности терапии с помощью ЛГРФ и его агонистов [6]. В определенной степени это может быть обусловлено использованием неадекватных экспериментальных моделей для отработки различных схем применения аЛГРФ в клинических целях. В частности, широко используемые в исследованиях мелкие лабораторные животные, например крысы, существенным образом отличаются от человека как по чувствительности к ЛГРФ и его агонистам, так и по механизму их регулирующего влияния на функцию гонад.

В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования способности агонистов ЛГРФ сурфагона (КНЦ РАН) и бузерелина (А. Hoechst, ФРГ) стимулировать секрецию гонадотропинов и половых стероидных гормонов с учетом дозы препаратов, а также фазы овариально-менструального цикла (МЦ) в эксперименте на низших приматах.

Материалы и методы

В опытах использованы 8 половозрелых фертильных самцов и 9 самок павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) в возрасте 8—10 лет массой тела соответственно 18—22 и 9—12 кг из Сухумского и Адлерского приматологических центров. Животных во время эксперимента содержали в индивидуальных метаболических клетках в комнате с контролируемой температурой и влажностью.

Самцам вводили раствор сурфагона в изотоническом растворе хлорида натрия — D-Ala⁶, desGly¹⁰-этиламид ЛГРФ (КНЦ РАН, Россия) внутривенно в дозе 5, 50, 500 и 5000 нг на 1 кг массы тела ($n = 5$), раствор бузерелина — D-Ser(t-Bu)⁶, desGly¹⁰-этиламид (А. Hoechst, ФРГ) внутривенно в дозе 500 и 5000 нг на 1 кг массы тела ($n = 3$) или только физиологический раствор ($n = 3$) для получения фоновых данных. Между двумя последовательными инъекциями препаратов выдерживали по крайней мере 2-недельный интервал. Образцы крови брали из локтевой ве-

ны непосредственно перед введением препаратов, а также через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после их введения.

Исследование влияния аЛГРФ на овариальную функцию обезьян проводили в зависимости от фазы МЦ с использованием 2 групп самок. Животным 1-й группы сурфагон в дозе 500 и 5000 нг/кг и физиологический раствор вводили в раннюю фолликулярную фазу (3—5 день МЦ; $n = 5$), а также во 2-й половине фолликулярной фазы (8—12-й день МЦ; $n = 3$), животным 2-й группы — в лютеальную (7—9-й день после овуляции; $n = 4$). Регистрацию овуляции проводили путем визуальной оценки состояния половой кожи в аногенитальной области, а также изучения динамики уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ), эстрадиола (Е₂) и прогестерона (Δ4Р) в периферической крови. Взятие крови проводили непосредственно перед введением, а также через 1, 5 и 24 ч после введения препаратов.

Как самцам, так и самкам аЛГРФ или физиологический раствор вводили в 9—10 ч, используя в качестве антикоагулянта гепарин. Плазму отделяли центрифугированием, замораживали и хранили при -20°C до проведения гормонального анализа, концентрацию тестостерона вместе с 5α-дигидротестостероном (Т), а также Е₂ и Δ4Р определяли радиоиммунологическими методами [2—4]. Уровень ЛГ измеряли с помощью биологического микрометода *in vitro* [14], адаптированного к плазме павианов [8]. В качестве стандарта использовали 1-й международный стандарт ВОЗ 69/104. Коэффициент вариации результатов определения для всех стероидных гормонов не превышал 10% в пределах одной реакции и 15% в разных сериях определений, для ЛГ — соответственно 9 и 17%. Площадь ответа аденогипофиза и семенников на введение аЛГРФ вычисляли по площади, лежащей под кривой, характеризующей изменения концентрации соответственно ЛГ или Т в плазме крови в зависимости от времени, прошедшего с момента введения препаратов. Статистическую обработку результатов анализа проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Самцы. Стимулирующее влияние однократной инъекции различных доз сурфагона на уровень Т и ЛГ в плазме периферической крови самцов иллюстрирует рис. 1. Сурфагон в дозе 5 нг/кг (см. рис. 1, з) оказывал слабое активирующее влияние на секрецию Т, более выраженное при учете динамики уровня Т на введение физиологического раствора (см. рис. 1, д). Однако в дозе 50 нг/кг (см. рис. 1, в), 500 нг/кг (см. рис. 1, б) и 5000 нг/кг (см. рис. 1, а) сурфагон оказывал выраженное стимулирующее действие на концентрацию как Т, так и

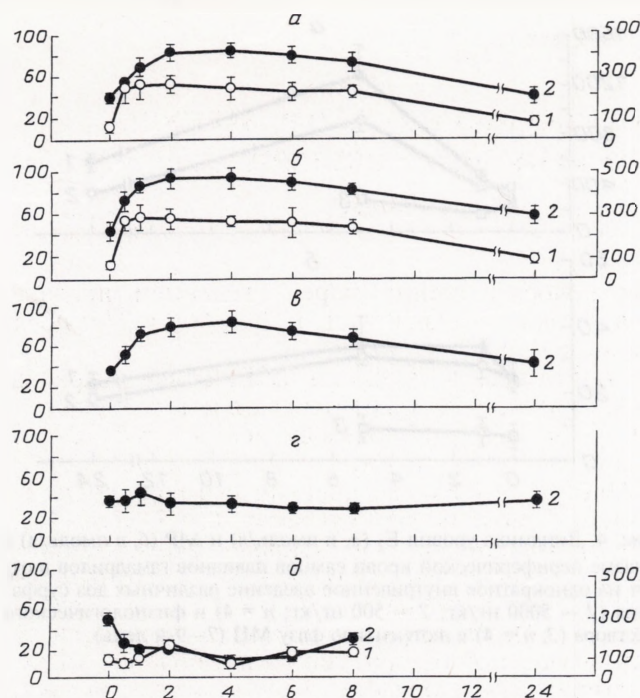


Рис. 1. Динамика уровня ЛГ (1) и Т (2) в плазме периферической крови самцов павианов гамадрилов в ответ на однократное внутривенное введение различных доз сурфагона.

а — 5000 нг/кг; б — 500 нг/кг; в — 50 нг/кг; г — 5 нг/кг ($n = 5$) и физиологического раствора (δ ; $n = 3$).

По осям ординат: слева — уровень Т (в нмоль/л), справа — уровень ЛГ (в мМЕ/мл); по осям абсцисс здесь и на рис. 3, 4 — время (в ч).

ЛГ, достигающую максимальных значений соответственно через 2 и 0,5–1 ч.

Активирующее влияние препарата на гипофизарно-тестикулярную систему сохранялось в течение по крайней мере 8 ч. Максимальные значения Т и ЛГ в абсолютных единицах не зависели от дозы сурфагона и колебались в интервале соответственно 80–95 нмоль/л и 200–260 мМЕ/мл. Эти величины хорошо согласуются с ранее полученными для павианов в условиях максимальной

Величина ответа Т и ЛГ на введение сурфагона и бузерелина в зависимости от дозы ($M \pm m$)

Доза препарата, нг/кг	Площадь ответа в течение 8 ч			
	Т		ЛГ	
	% в час	нмоль/л в час	% в час	нмоль/л в час
<i>Сурфактон</i>				
5	39 ± 24	6 ± 2	—	—
50	602 ± 130*	222 ± 40*	—	—
500	563 ± 126*	201 ± 59*	1970 ± 250	1220 ± 107
5000	591 ± 77*	208 ± 28*	2010 ± 370	1110 ± 129
<i>Бузерелин</i>				
500	620 ± 120	186 ± 38	1150 ± 230	1100 ± 82
5000	628 ± 100	201 ± 73	985 ± 240	973 ± 190

Примечание. * — $p < 0,001$ по отношению к соответствующим значениям при введении сурфагона в дозе 5 нг/кг. Каждую дозу препарата вводили 5 животным.

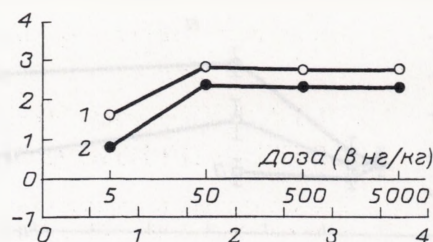


Рис. 2. Зависимость показателей стимулирующего действия сурфагона на гормональную функцию семенников от дозы.

По оси ординат: $\lg$ площади ответа Т за 8-часовой период; по оси абсцисс: $\lg$ дозы сурфагона. 1 — кривая зависимости площади ответа Т, выраженной в относительных единицах (% в час), от дозы сурфагона: $\lg Y = -0,4 (\lg X)^2 + 2,1 \lg X - 0,3$; 2 — кривая зависимости площади ответа Т в абсолютных единицах (нмоль/л в час) от дозы сурфагона: $\lg Y = -0,5 (\lg X)^2 + 2,7 \lg X - 0,8$.

стимуляции функции аденогипофиза и гонад [1], свидетельствуя о максимальной стимуляции гипофизарно-тестикулярной системы при введении сурфагона в дозе 50–5000 нг/кг. В то же время в отличие от кратковременной активации секреции ЛГ и Т после однократного введения нативного ЛГРФ [1] введение сурфагона индуцировало пролонгированное повышение уровней ЛГ и Т.

Площадь ответа Т и ЛГ за 8-часовой период (см. таблицу) была практически одинаковой для 3 исследуемых доз сурфагона (50, 500, 5000 нг/кг) как в относительных (% в час), так и в абсолютных величинах. В то же время введение сурфагона в дозе 5 нг/кг индуцировало в 20–40 раз меньшую тестикулярную активность (см. таблицу). Зависимость площади ответа Т от дозы сурфагона выражалась биквадратным уравнением от логарифмических функций вида

$$\lg Y = a (\lg X)^2 + b \lg X + c,$$

где Y — площадь ответа Т за 8 ч; X — доза препарата (в нг на 1 кг массы тела); a , b , c — коэффициенты, зависящие от единиц измерения площади ответа, исходного уровня Т, индивидуальных особенностей динамики уровня Т в ответ на введение сурфагона (рис. 2).

Динамика уровня Т и ЛГ в плазме периферической крови обезьян при однократном введении бузерелина в дозе 500 и 5000 нг/кг носила сходный характер с изменением уровня половых гормонов в ответ на введение соответствующих доз сурфагона. Площадь ответа Т и ЛГ за исследуемый 8-часовой период как в абсолютных, так и в относительных единицах практически не различалась для исследуемых доз бузерелина и была сравнима с таковой, индуцированной введением соответствующих доз сурфагона (см. таблицу). Однако при этом следует отметить существенно более низкие значения площади ответа ЛГ, выраженные в относительных единицах, по сравнению с соответствующими значениями для площади аденогипофизарного ответа, индуцированного введением сурфагона. Последнее, очевидно, обусловлено различиями в базальных уровнях ЛГ, которые для животных, получавших сурфактон, составляли в среднем 59 ± 8 мМЕ/мл, бузерелин — 98 ± 7 мМЕ/мл.

Самки. Фолликулярная фаза. Динамика уровня E_2 и $\Delta 4P$ у самок при инъекции различных доз сурфагона в раннюю фолликулярную фазу пред-

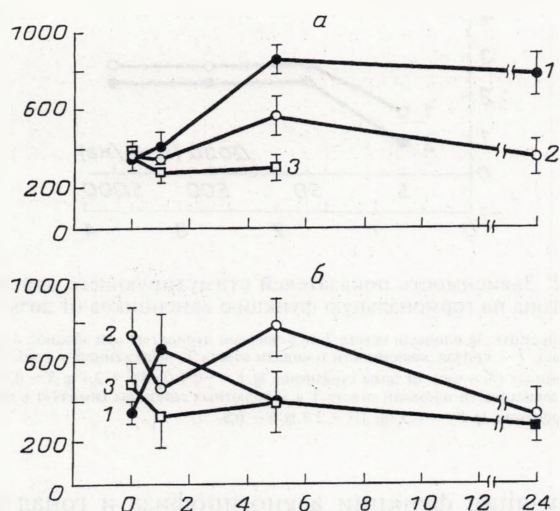


Рис. 3. Динамика уровня E_2 (а, в пмоль/л) и $\Delta 4P$ (б, в пмоль/л) в плазме периферической крови самцов павианов гамадрилов в ответ на однократное внутривенное введение различных доз сурфагона (1 — 5000 нг/кг; 2 — 500 нг/кг; $n = 5$) и физиологического раствора (3; $n = 3$) в раннюю фолликулярную фазу МЦ (3—5-й день).

ставлена на рис. 3. Как видно, сурфагон в дозе 5000 нг/кг оказывал выраженное активирующее действие на стероидогенез в фолликулах. Так, через 5 ч после инъекции содержание E_2 более чем в 2 раза превышало его исходную концентрацию и сохранялось на достигнутом уровне в течение 24 ч ($p < 0,001$). В дозе 500 нг/кг сурфагон оказывал менее выраженное активирующее влияние на концентрацию E_2 через 5 ч (577 ± 90 пмоль/л против 366 ± 80 пмоль/л до введения; $p > 0,05$), которая через 24 ч возвращалась к исходному уровню. Следует отметить, что в отличие от большинства животных у одной из самок, получавшей сурфагон в дозе 500 нг/кг, отмечалось резкое повышение уровня E_2 через 5 ч после введения, сравнимое с аналогичным подъемом при введении сурфагона в дозе 5000 нг/кг. Однако в отличие от последнего через 24 ч уровень E_2 возвращался к исходным значениям.

Уровень $\Delta 4P$ статистически достоверно не изменялся при введении сурфагона в дозе как 5000 нг/кг, так и 500 нг/кг. Следует, однако, отметить четкую тенденцию к повышению уровня $\Delta 4P$ через 1 ч после введения сурфагона в дозе 5000 нг/кг. Последнее, очевидно, является отражением базального характера овариального стероидогенеза в раннюю фолликулярную фазу, который еще не приобрел особенности, детерминированные функционированием фолликула. Выброс ЛГ, стимулированный введением сурфагона, индуцируя ранний ключевой этап стероидогенеза — трансформацию холестерина в прегненолон, стимулирует, очевидно, и превращение последнего в $\Delta 4P$, возможно, путем простой субстратной индукции. Через 5 и 24 ч активируется синтез эстрогенов, характерный для фолликулярной фазы.

Введение сурфагона во 2-ю половину фолликулярной фазы не оказывало влияния на содержание $\Delta 4P$ в крови и стимулировало секрецию E_2 на протяжении суток (890 ± 98 пмоль/л через 5

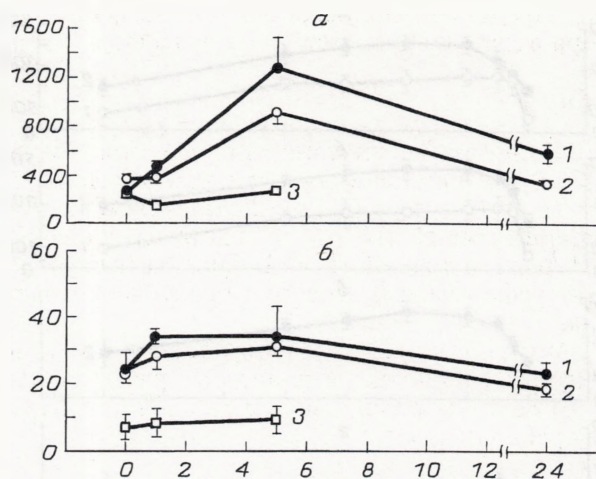


Рис. 4. Динамика уровня E_2 (а, в пмоль/л) и $\Delta 4P$ (б, в пмоль/л) в плазме периферической крови самцов павианов гамадрилов в ответ на однократное внутривенное введение различных доз сурфагона (1 — 5000 нг/кг; 2 — 500 нг/кг; $n = 4$) и физиологического раствора (3; $n = 4$) в лютеальную фазу МЦ (7—9-й день).

ч, 962 ± 96 пмоль/л через 24 ч против 560 ± 18 пмоль/л до введения; $p < 0,01$).

Следует отметить, что введение сурфагона в раннюю фолликулярную фазу в дозе 5000 нг/кг у 2 из 5 экспериментальных животных сопровождалось изменениями в характере и продолжительности МЦ. У одной из самок МЦ был укорочен до 18 дней (в контрольном периоде — 32—33 дня) и носил ановуляторный характер, а у другой, напротив, — удлинен до 35 дней (в контроле — 25 дней) за счет увеличения продолжительности фолликулярной фазы. Сходные нарушения МЦ при введении аЛГРФ в первые дни МЦ наблюдались и у других видов обезьян [13, 15]. Следует подчеркнуть, что глубокое влияние аЛГРФ на задержку фолликулогенеза наблюдали только в тех случаях, когда эти пептиды вводили в раннюю фолликулярную фазу. Так, как уже отмечалось выше, введение сурфагона во 2-ю половину фолликулярной фазы, оказывая выраженное стимулирующее влияние на секрецию E_2 , не приводило к нарушению процессов овуляции и продолжительности МЦ. Очевидно, нарушения обусловлены ингибирующим влиянием высоких концентраций гонадотропинов, индуцированных введением аЛГРФ, на процесс отбора фолликулов до селекции доминирующего фолликула.

Лютеальная фаза. Введение сурфагона в дозе 5000 нг/кг приводило к существенному повышению уровня $\Delta 4P$ через 1 ч после инъекции ($34 \pm 1,5$ нмоль/л против 24 ± 4 нмоль/л; $p < 0,05$), которое сохранялось на том же уровне в течение 5 ч (рис. 4), подтверждая важную роль ЛГ в регуляции функции желтого тела. В дозе 500 нг/кг сурфагон не давал выраженного лютеотропного эффекта. Помимо стимуляции синтеза $\Delta 4P$, сурфагон активировал секрецию эстрогенов, более выраженную при введении 5000 нг/кг. Однако в отличие от $\Delta 4P$ максимальный стимулирующий эффект агониста на концентрацию E_2 наблюдался позже, т. е. только через 5 ч, но частично сохранялся и через сутки при введении сурфагона в дозе 5000

нг/кг. Продолжительность МЦ при введении сурфагона в лютеальную фазу не нарушалась.

Выводы

1. Однократное внутривенное введение сурфагона и бусерелина самцам павианов гамадрилов в дозах 50, 500 и 5000 нг/кг индуцирует резкое повышение уровней ЛГ и Т в плазме периферической крови в течение 8 ч. Биологическая активность сурфагона и бусерелина практически идентична.

2. Активирующее влияние сурфагона на гормональную активность семенников носит зависимый от дозы характер, выражающийся биквадратным уравнением вида

$$\lg Y = a (\lg X)^2 + b \lg X + c,$$

где Y — площадь ответа Т за 8 ч; X — доза препарата (в нг на 1 кг массы тела); a , b , c — коэффициенты, зависимые от единиц измерения площади ответа, исходного уровня Т и индивидуальных особенностей реакции семенников на введение сурфагона.

3. Однократное внутривенное введение сурфагона самкам павианов гамадрилов в раннюю фолликулярную фазу индуцирует пролонгированную активацию секреции эстрадиола, более выраженную в дозе 5000 нг/кг. Активирующее влияние сурфагона на фолликулярный стероидогенез может сопровождаться последующими нарушениями в характере и продолжительности МЦ.

4. Однократное внутривенное введение сурфагона самкам павианов гамадрилов в лютеальную фазу МЦ оказывало лютеотропное действие, а также вызывало активацию секреции эстрадиола, существенно более выраженные при введении препарата в дозе 5000 нг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Н. Д., Гончаров Н. П. // Пробл. эндокринологии. — 1989. — № 5. — С. 68–72.
2. Инструкция к набору реактивов для радиоиммунологического определения тестостерона в плазме крови / Гончаров Н. П., Кацья Г. В., Гончарова Н. Д. и др. — М., 1986.

3. Инструкция к набору реактивов для радиоиммунологического определения прогестерона в плазме крови / Гончаров Н. П., Кацья Г. В., Гончарова Н. Д. и др. — М., 1986.
4. Инструкция к набору реактивов для радиоиммунологического определения эстрадиола в плазме крови / Гончаров Н. П., Кацья Г. В., Гончарова Н. Д. и др. — М., 1986.
5. Abdalla H. I., Ahuja K. K., Leonard T. et al. // Fertil. Steril. — 1990. — Vol. 53, N 3. — P. 473–478.
6. Furr B. J. A., Woodburn J. R. // J. Endocrinol. Invest. — 1988. — Vol. 11, N 7. — P. 535–557.
7. Ghai K., Cara J. F., Rosenfield R. L. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1995. — Vol. 80, N 10. — P. 2980–2986.
8. Goncharov N. P., Antonichev A. V., Goruschkin V. M. et al. // Acta endocrinol. — 1979. — Vol. 91. — P. 49–58.
9. Ibanez L., Potau N., Zampolli M. et al. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1994. — Vol. 78, N 1. — P. 30–35.
10. Jacobs H. S., Porter R., Eshal A., Craft I. // LHRH and its Analogs Contraceptive and Therapeutic Applications / Eds B. H. Vickery, J. J. Nestor. — Lancaster, 1987. — Pt 2. — P. 303.
11. Lejonne B., Barlow P., Puissant F. et al. // Fertil. Steril. — 1990. — Vol. 54, N 3. — P. 475–481.
12. Martin K., Santoro N., Hall J. et al. // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1990. — Vol. 71, N 5. — P. 1080–1086.
13. Sopelak V. M., Williams R. F., Hodgen G. D. // Factors Regulating Ovarian Function / Eds G. S. Greenwald, P. F. Teranova. — New York, 1983. — P. 245–249.
14. Wickings F. J., Qazi M. H., Nieschlag E. // J. Reprod. Fertil. — 1979. — Vol. 57. — P. 497–504.
15. Wilks J. W. // Acta endocrinol. — 1984. — Vol. 106. — P. 538–543.

Поступила 26.06.96

N. D. Goncharova — ACUTE EFFECTS OF AGONISTS OF LUTEINIZING HORMONE RELEASING FACTOR (LHRF) ON THE PITUITARY, TESTICULAR, AND OVARIAN FUNCTION IN MONKEYS

Summary. The biological activities of LHRF superactive agonists surfagon (Russia), a promising agent for correcting many disorders of the reproductive function, and busereline (Hoechst A. G., Germany) were assessed by their capacity to stimulate gonadotropin and sex steroids secretion in experiments on adult Papio hamadryas. A single intravenous injection of surfagon and busereline to male monkeys in doses of 50, 500, and 5000 ng/kg similarly stimulated the secretion of luteinizing hormone and testosterone for at least 8 h. Injection of surfagon to females during the early follicular phase induced a prolonged activation of estradiol secretion, more expressed after a dose of 5000 ng/kg. The activating effect of LHRF agonist on follicular steroidogenesis may be associated with subsequent disorders in the pattern and duration of the ovarian menstrual cycle. Injection of surfagon in the middle of the luteal phase had both a luteotropic effect and sharply activated the secretion of estrogens, particularly expressed after a dose of 5000 ng/kg.

♦ ОБЗОРЫ

© А. Н. КАРАЧЕНЦЕВ, П. В. СЕРГЕЕВ, 1977

УДК 612.018:577.175.6]08(048.8)

А. Н. Караченцев, П. В. Сергеев

ВАЗОАКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Кафедра молекулярной фармакологии с курсом радиобиологии (зав. — акад. РАМН П. В. Сергеев) медико-биологического факультета Российского государственного медицинского университета, Москва

Обширный экспериментальный и клинический материал, приводимый в современной научной литературе, свидетельствует о влиянии половых гормонов на сердечно-сосудистую систему и необходимости учета изменений в ее деятельности при терапии препаратами, содержащими данные

биологически активные вещества [3, 5, 7, 71]. Наряду с опосредованными через структуры центральной нервной системы и циркулирующие в кровеносной системе многочисленные соединения геномные вазоактивные эффекты всех стероидных соединений, включая половые гормоны,