

О. П. Черкасова, В. И. Федоров

ОДНОВРЕМЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОРТИКОСТЕРОНА И 11-ДЕГИДРОКОРТИКОСТЕРОНА В НАДПОЧЕЧНИКАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ

Лаборатория физиологии и биофизики Института лазерной физики (дир. — акад. С. Н. Багаев) Сибирского отделения РАН. Новосибирск

Исследовано содержание кортикостерона и его обратимого метаболита 11-дегидрокортикостерона в плазме крови и надпочечниках интактных крыс и после лапаротомии. Показано, что у крыс по сравнению с людьми уровень основного глюкокортикоида в плазме крови значительно выше уровня его обратимого метаболита. При остром стрессе обнаружено увеличение содержания 11-дегидрокортикостерона в надпочечниках на фоне повышения уровня кортикостерона в плазме крови, что расценено как создание резервного пула кортикостерона.

Adrenal and plasma levels of corticosterone and 11-dehydrocorticosterone were measured in intact and stressed (laparotomy) rats by microcolumn high performance liquid chromatography. In contrast to humans, in rats plasma level of basic glucocorticoid is essentially higher than the level of its reversible metabolite. Acute stress (laparotomy) led to an increase in the adrenal concentration of 11-dehydrocorticosterone and plasma concentration of corticosterone, which was regarded as creation of a reserve corticosterone pool.

Кортикостерон является основным глюкокортикоидом у крыс, а 11-дегидрокортикостерон (вещество А по классификации Т. Рейхштейна) — его обратимым метаболитом. Взаимопревращение этих гормонов осуществляется ферментом 11 β -оксистероиддегидрогеназой (ЕС 1.1.1.146).

Существуют 2 изоформы этого фермента. Первая изоформа (НАДФ-зависимая) катализирует преимущественно реакцию восстановления 11-дегидрокортикостерона в кортикостерон. Эта изоформа солокализована с глюкокортикоидными рецепторами различных тканей. Ее активность индуцируется глюкокортикоидами по механизму положительной обратной связи [3]. У самцов крыс активность этой изоформы фермента в печени в 2 раза выше, чем у самок, так как эстрогены подавляют транскрипцию ее гена в печени самок [6]. Активность этой изоформы фермента повышается при хроническом стрессе [5, 6].

В надпочечниках крыс эта изоформа фермента локализована преимущественно в кортикальных клетках, пограничных мозговому слою, и играет важную роль в регуляции биосинтеза адреналина, создавая высокую концентрацию кортикостерона в мозговом слое надпочечника.

Вторая изоформа (НАДН-зависимая) катализирует реакцию окисления, тем самым превращая кортикостерон в относительно неактивный 11-дегидрокортикостерон [15]. Данная изоформа фермента у крыс обнаружена в классических тканях-мишенях альдостерона (мозг, почки, слюнные железы, кишечник, сосуды), где она солокализована с минералокортикоидными рецепторами, в женской репродуктивной системе, в клетках Лейдига [10, 12, 14], т. е. в тех тканях, где необходима инактивация избытка глюкокортикоидов, а также в коре надпочечников, где она в отличие от 1-й изоформы распределена примерно одинаково во всех зонах и имеет митохондриальную, внутриядерную и митохондриальную локализацию, тогда как 1-я изоформа — только митохондриальную. Наибольшее содержание 2-й изоформы фермента встречается в надпочечниках самцов крыс [13]. Активность этой изоформы ингибируется продуктом реакции — 11-дегидрокортикостероном [7].

Существует и неконкурентное ингибирование активности 2-й изоформы фермента, осуществляемое вторичными посредниками рецепторов АКТГ [8]. Показано также, что при повышении концентрации АКТГ в крови крыс происходит уменьшение конверсии кортикостерона в 11-дегидрокортикостерон в сетчатой и пучковой зонах коры надпочечников [2]. В интактных условиях перфузаты надпочечников крыс выделяют в инкубационную среду значительное количество 11-дегидрокортикостерона, тогда как при введении АКТГ наблюдали значительное увеличение отношения кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в пучковой зоне, увеличение секреции кортикостерона и значительное уменьшение выделения 11-дегидрокортикостерона [9].

Таким образом, наличие двух изоформ фермента и характер их регуляции, секреция 11-дегидрокортикостерона надпочечниками свидетельствуют о значимости исследования содержания этого вещества при различных состояниях организма.

Целью настоящей работы явилось одновременное исследование содержания кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в плазме крови и надпочечниках интактных крыс и изменения этих показателей при остром стрессовом воздействии.

Материалы и методы

Исследование влияния острого стрессового воздействия проведено на крысах-самках линии Вистар 5-месячного возраста. Подопытных животных подвергали лапаротомии под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно) после предварительного рауш-наркоза. Общее время нахождения крыс под наркозом составило 70 мин. Контролем служили интактные животные того же возраста. Оперативная подготовка выполнена сотрудниками центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского медицинского института под руководством Г. Н. Шориной.

Кровь и оба надпочечника забирали у всех животных после декапитации. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин при 4°C. Плазму отделяли

Животные	Кортикостерон		11-Дегидрокортикостерон		Кортикостерон/11-дегидрокортикостерон	
	плазма крови, нг/мл	надпочечники, нг	плазма крови, нг/мл	надпочечники, нг	плазма крови	надпочечники
Интактные ($n = 8$)	$588,0 \pm 32,0$	$1167,8 \pm 234,9$	$37,9 \pm 5,6$	$99,0 \pm 20,9$	$19,7 \pm 2,8$	$11,9 \pm 1,4$
Подопытные ($n = 10$)	$1141,0 \pm 117,0^*$	$1169,3 \pm 146,6$	$56,0 \pm 13,0$	$182,8 \pm 26,4^*$	$30,9 \pm 8,9^*$	$7,5 \pm 1,1^*$

Примечание. Звездочка — достоверные ($p < 0,05$) отличия относительно интактных животных.

и либо немедленно анализировали, либо хранили до дня анализа при -20°C . Концентрацию кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в плазме крови определяли методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе "Милихром-1" (НПО "Научприбор", г. Орел) [1].

Надпочечники отделяли от жировой ткани, взвешивали на торсионных весах ВТ-500. Каждый надпочечник переносили в индивидуальный стеклянный гомогенизатор, находящийся в ледяной ванне. Затем в гомогенизатор добавляли 2,5 мл охлажденного ацетона (ч.д.а.) и тщательно растирали в течение 1—1,5 мин до полного измельчения ткани. Для анализа использовали 8 мкл гомогената. Затем его подвергали той же хроматографической процедуре, что и плазму крови.

Результаты и их обсуждение

У интактных животных уровень кортикостерона в плазме крови составил $588,0 \pm 32,0$ нг/мл, уровень 11-дегидрокортикостерона — $37,9 \pm 5,6$ нг/мл (см. таблицу). Первое значение согласуется с данными о содержании кортикостерона в плазме крови крыс-самцов линии Вистар, также полученными методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [4]. Мы обращаем внимание на это замечание, так как в подавляющем большинстве опубликованных работ исследование кортикостерона в крови крыс проводится неселективными способами (флюориметрический, радиоиммунный, иммуноферментный, метод конкурентного белкового связывания), сравнение с которыми не имеет смысла. Что касается уровня 11-дегидрокортикостерона, то в литературе нет сведений о его исследовании в крови крыс или других лабораторных животных.

В клинической практике используется коэффициент кортизол/кортизон [11], изменения которого отражают функциональное состояние глюкокортикоидной системы. Поэтому представляло интерес оценить отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон у крыс. Оно составило у интактных животных $19,7 \pm 2,8$. По данным нашей лаборатории, коэффициент кортизол/кортизон в сыворотке крови здоровых лиц равен $4,34 \pm 0,1$. Таким образом, у крыс по сравнению с людьми уровень ведущего глюкокортикоида в плазме крови значительно превышает уровень его обратимого метаболита.

Суммарное содержание кортикостерона в надпочечниках интактных животных составило в среднем $1167,8 \pm 234,9$ нг, 11-дегидрокортикостерона — $99,0 \pm 20,9$ нг. Отношение этих гормонов составило $11,9 \pm 1,4$ (см. таблицу). Отсюда видно, что у интактных животных содержание кортикостерона в надпочечниках, так же как и в плазме крови, зна-

чительно выше, чем 11-дегидрокортикостерона. Эти данные оригинальны, поскольку в доступной литературе и базах данных информационных систем не удалось найти работ, где бы исследовали содержание кортикостероидных гормонов в надпочечниках крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Ранее надпочечники исследовали методом тонкослойной хроматографии, предел чувствительности которого составляет около 100 нг на 1 определение и потому для определения гормонов в надпочечниках для анализа брали органы от нескольких животных.

У крыс, подвергнутых лапаротомии, мы наблюдали двукратное достоверное увеличение уровня кортикостерона в плазме крови по сравнению с интактными животными. По уровню 11-дегидрокортикостерона достоверных отличий от контроля не отмечено. Отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон увеличилось достоверно (см. таблицу).

Таким образом, под влиянием острого стрессового воздействия уровень кортикостерона в большей степени, чем в контроле, превышает уровень его обратимого метаболита в плазме крови.

Суммарное содержание кортикостерона в надпочечниках крыс, подвергнутых лапаротомии, практически не отличалось от контрольных значений. Содержание 11-дегидрокортикостерона было достоверно увеличено. В результате отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в ткани надпочечников достоверно снизилось (см. таблицу).

Соотношение исследуемых гормонов в плазме крови и ткани надпочечников показывает, что острое стрессовое воздействие приводит к повышению секреции кортикостерона, поскольку при сходном содержании гормона в надпочечниках его уровень в плазме крови становится в 2 раза выше, и к снижению секреции 11-дегидрокортикостерона, поскольку прирост его содержания в надпочечниках непропорционально выше, чем в плазме крови. Об этом же свидетельствуют и их попарные отношения. Также не исключено превращение 11-дегидрокортикостерона в кортикостерон в печени, катализируемое 1-й (печеночной) изоформой 11 β -оксистероиддегидрогеназы, активность которой повышается при стрессе (см. введение). Кроме того, сопоставляя значения концентрации 11-дегидрокортикостерона в плазме крови и его содержания в ткани надпочечников, можно предположить, что острое стрессовое воздействие вызывает образование "стратегического запаса" кортикостерона в надпочечниках в виде накопления его обратимого метаболита, что достигается активизацией 2-й изоформы 11 β -оксистероиддегидрогеназы в надпочечниках.

Таким образом, настоящее исследование показало, что суждение о глюкокортикоидной функции надпочечников будет более полным, если одновременно анализировать содержание и кортикостерона, и его обратимого метаболита 11-дегидрокортикостерона как в плазме крови, так и в ткани надпочечников. По-видимому, 11-дегидрокортикостерон можно рассматривать как функциональный аналог кортизола у тех видов животных, у которых основным глюкокортикоидом является кортикостерон.

Выводы

1. Отношение содержания в плазме крови крыс основного глюкокортикоида и его обратимого метаболита существенно превышает подобный показатель у людей.

2. При остром стрессе (лапаротомия) увеличение секреции кортикостерона сочетается с повышением содержания 11-дегидрокортикостерона в ткани надпочечников, что создает резервный пул основного глюкокортикоида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байкова Л. А., Федоров В. И., Черкасова О. П. // Лаб. дело. — 1989. — № 5. — С. 57—60.

2. Bell J. B., Gould R. P., Hyatt P. J. et al. // J. Endocrinol. — 1979. — Vol. 83, N 3. — P. 435—447.
3. Hundertmark S., Buhler H., Ragosch V. et al. // Endocrinology. — 1995. — Vol. 136, N 6. — P. 2573—2578.
4. Imaizumi N., Yamamoto I., Kamei M. et al. // Hormone Res. — 1987. — Vol. 27, N 1. — P. 56—60.
5. Jellinck P. H., Dhabhar F. S., Sakai R. R., McEwen B. S. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1997. — Vol. 60, N 5—6. — P. 319—323.
6. Low S. C., Chapman K. E., Edwards C. R. et al. // J. Endocrinol. — 1994. — Vol. 143, N 3. — P. 541—548.
7. Morita H., Zhou M., Foecking M. F. et al. // Endocrinology. — 1996. — Vol. 137, N 6. — P. 2308—2314.
8. Morita H., Cozza E. N., Zhou M. Y. et al. // Endocrine. — 1997. — Vol. 7, N 3. — P. 331—335.
9. Musajo F., Neri G., Tortorella C. et al. // Life Sci. — 1996. — Vol. 59, N 17. — P. 1401—1406.
10. Nacharaju V. L., Muneyyirci-Delale O., Khan N. // Steroids. — 1997. — Vol. 62, N 3. — P. 311—314.
11. Nomura S., Fujitaha M., Sakura N., Uedi K. // Clin. Chim. Acta. — 1997. — Vol. 266, N 2. — P. 83—91.
12. Roland B. L., Funder J. W. // Endocrinology. — 1996. — Vol. 137, N 3. — P. 1123—1128.
13. Shimomo M., Condon J., Whorwood C. B., Stewart P. M. // Endocr. Res. — 1996. — Vol. 22, N 4. — P. 771—780.
14. Slight S. H., Ganjam V. K., Gomez-Sanchez C. E. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1996. — Vol. 28, N 4. — P. 781—787.
15. Yau J. L., Van Haarst A. D., Moisan M. P. et al. // Am. J. Physiol. — 1991. — Vol. 260, N 5, Pt 2. — P. F764—F767.

Поступила 05.08.99

♦ ОБЗОР

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.379-008.64-092:616.633.857.4

Г. Г. Мейрамов, К.-Д. Конерт, А. Г. Мейрамова

О ДИАБЕТОГЕННОМ ДЕЙСТВИИ КСАНТУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Государственный университет, Караганда; Институт патофизиологии Грейфсвальдского университета "Эрнст-Моритц-Арндт", Карлсбург, ФРГ

В 1935 г. L. Musajo и соавт. сообщили о синтезе ксантуреновой кислоты. Это химическое вещество было выделено из мочи экспериментальных животных и идентифицировано как 4,8-дигидрооксихинолин-2-карбоновая кислота [55]. Химическая формула $C_{10}H_7NO_4$.

Это соединение заинтересовало группу исследователей во главе с S. Lerkovsky и соавт. [47]. В условиях накопления в организме избыточного количества жирных кислот и триптофана на фоне дефицита витамина B_6 (пиридоксин) отмечалось усиленное образование ксантуреновой кислоты в тканях. Это сопровождалось появлением у животных признаков, характерных для сахарного диабета [28, 32, 33, 37, 71].

Ксантуреновая кислота является продуктом измененного обмена триптофана, в обычных условиях подвергающегося метаболизации по серотониновому и кинурениновому путям (рис. 1), которые при этом завершаются формированием соответственно 5-оксиндолаксусной кислоты и НАДФ [30]. Недостаток пиридоксаль-5-фосфата (П-5-Ф), вызываемый дефицитом витамина B_6 , ведет к угнетению 5-окситриптофан-декарбоксилазы и кинурениназы, что сопровождается подавлением процессов метаболизации по обоим путям. В результате образуются 4 соединения: ксантуреновая кислота и 8-оксихинальдин из 3-окскинурина, а также кинуреновая и окскинуриновая кислоты из кинуренина [21, 49, 64, 76].

Ключевыми ферментами в образовании ксантуреновой кислоты являются кинуренинаминотрансфераза и окситриптофан-декарбоксилаза, коферментом которых служит П-5-Ф [49, 65]. Под влиянием кинуренинаминотрансферазы из 3-окскинурина образуется ксантуреновая кислота. При недостаточности в организме П-5-Ф образование серотонина снижается, а

синтез ксантуреновой и кинуреновой кислот возрастает [47, 68]. Однако здесь возникает, казалось бы, противоречие: почему дефицит П-5-Ф тормозит синтез серотонина и стимулирует образование ксантуреновой кислоты? С одной стороны, это объясняется тем, что пиридоксальные ферменты системы межклеточного обмена триптофана по-разному реагируют на дефицит П-5-Ф: если активность кинурениназы снижается на 83%, то кинуренинаминотрансферазы — всего на 42% [76]. С другой стороны, при изучении локализации ферментных систем в клетках печени и почек было установлено, что кинуренинаминотрансфераза находится как в митохондриях, так и в растворимой части клетки, тогда как кинурениназа — только в растворимой части клетки. При недостатке П-5-Ф в организме содержание этих двух ферментов в растворимой части клетки существенно снижается, а уровень митохондриальной кинуренинаминотрансферазы остается прежним [44]. Этим объясняется увеличение выделения с мочой ксантуреновой кислоты. Впервые повышенные количества ксантуреновой кислоты были обнаружены в моче белых крыс, содержащихся на рационе, богатом триптофаном и лишенном витамина B_6 . Добавление витамина к пище сопровождалось исчезновением ксантуреновой кислоты из мочи [30, 70]. Однако при далеко зашедшем авитаминозе B_6 происходит снижение активности кинуренинаминотрансферазы, что сопровождается уменьшением ее выделения с мочой [78]. Позднее ксантуреновая кислота была обнаружена в моче у кроликов, собак, морских свинок и у человека [21, 23, 28].

Повышенное выделение ксантуреновой кислоты с мочой отмечается у больных сахарным диабетом в среднем и пожилом возрасте. У лиц пожилого возраста [20] с мочой выделяются повышенные количества ксантуреновой и кинуреновой кислот.