

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 616.43-008.6

МОДУЛЮВАННЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНОМ ЕФЕКТУ 17 β -ЕСТРАДІОЛУ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ-САМЦІВ

Н. М. ГУЛА, С. А. ШОВКУН, Є. М. ГРІНЧЕНКО, Т. М. ГОРІДЬКО,
А. Г. БЕРДИШЕВ, О. О. БАРБОТЬКО, О. С. МИКОША

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Досліджували вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) на рівень сумарних 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) і тестостерону у плазмі крові щурів-самців у нормі та за триденного введення 17 β -естрадіолу в дозі 400 мкг/кг маси тіла. Показано, що пероральне введення NSE інтактним тваринам протягом 7 днів в дозі 50 мкг/кг маси тіла не змінює рівень 11-ОКС та тестостерону. За умов введення 17 β -естрадіолу NSE запобігає різкому підвищенню рівня 11-ОКС і нормалізує рівень тестостерону у плазмі крові. Про можливість опосередкованого впливу NSE на сім'яники через моделювання ефектів гормонів системи гіпоталамус–гіпофіз побічно свідчить відновлення маси аденогіпофіза, яка знижується під впливом 17 β -естрадіолу. На рівні сім'яників ефект NSE під час проведення естрогенізації щурів-самців проявляється у гальмуванні процесів пероксидного окислення ліпідів, а саме: зменшенні вмісту ТБК-реагуючих продуктів і збільшенні активності ензимів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази та каталази. Слід зауважити, що NSE виявляє вираженіший антиоксидантний ефект порівняно з вітаміном Е, захищаючи клітини Лейдига сім'яників у разі підвищеного рівня естрогенів в організмі.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, 17 β -естрадіол, сім'яники, тестостерон, 11-гідроксикортикостероїди, аденогіпофіз, пероксидне окислення ліпідів, ферменти антиоксидантного захисту.

Регуляція репродуктивної функції вкрай складна і включає інтегративну участь великої кількості систем. В останні десятиріччя встановлені факти участі ендоканабіноїдної системи в регуляції репродуктивної функції за норми і патології. Відомо, що тетрагідроканабінол знижує у крові курців маріхуани рівень найважливішого гіпофізарного гормону – лютропіну. Введення анандаміду, ендogenous лінганду рецепторів канабіноїдів, пригнічує секрецію лютропіну і тестостерону в мишей [1, 2]. З іншого боку, нокаут СВ1 рецепторів у самців мишей знижує в крові рівень лютропіну та тестостерону. В той же час рівень мРНК рецептора СВ1 у гіпофізі залежить від рівня статевих гормонів у крові щурів [3]. Кастрація самців знижувала рівень мРНК рецептора СВ1, що передбачає можливий стимулювальний ефект андрогенів в експресії цього гена. У самок вміст мРНК рецептора СВ1 у гіпофізі змінювався протягом оваріального циклу обернено пропорційно рівню естрогенів. Між анандамідом і естрогенами встановлено антагонізм щодо їхнього впливу на

секрецію люліберіну гіпоталамусом [4]. Цей антагонізм встановлено на системному рівні, а його біохімічний механізм не досліджено. Проте відомо, що у самок щурів у гіпофізі та гіпоталамусі вміст анандаміду значно вищий, ніж у самців і найбільша його кількість спостерігається на стадії еструсу, коли вміст естрогенів у крові максимальний [3].

Ендогенні канабіноїди можуть брати участь у регуляції репродуктивної системи не тільки на рівні гіпоталамуса та гіпофіза, але і периферійних органів. Зокрема, рецептори канабіноїдів знайдено в сім'яниках і сперматозоїдах. Ці дані узагальнено в оглядах [5, 6]. Роль ендогенних канабіноїдів з насиченими жирнокислотними ланцюжками в органах репродуктивної системи не з'ясована, проте можна думати, що ці ендоканабіноїди виконують якісь захисні функції. Відомо, що у разі ушкодження сім'яників щурів іонами кадмію у тканині через дев'ять годин вміст пальмітоїлетаноламіну зростає майже в 40 разів, стеароїлетаноламіну більш ніж у 20 разів, а анандаміду в 5 разів [7].

Функція сім'яників може ушкоджуватися багатьма факторами, серед яких є і рослинні ізофлавоноїди дадзеїн та геністеїн, які можуть потрапляти в організм людини із продуктами із сої [8, 9]. Виявляючи естрогенну активність, вони здатні спричинювати ушкодження сім'яників [10]. Використання естрогенів із лікувальною метою при аденомі і раку передміхурової залози також призводить до ушкодження сім'яників, причому це є результатом як блокади секреції лютропіну, так і можливим прямим впливом на тканину [11].

Аналіз біохімічних змін у сім'яниках щурів, які зумовлені 17β -естрадіолом і можливість коригування цих змін насиченим NAE, зокрема N-стеароїлетаноламіном, становить мету пропонованої роботи. Оскільки в основі ушкоджуючої дії естрогенів може бути активація процесів пероксидації, то ми аналізували паралельно з NSE вплив такого відомого антиоксиданту як вітамін Е.

Матеріали і методи

Експерименти були проведені на білих статевозрілих щурах-самцях із середньою масою тіла 250 г, які знаходились на стандартному раціоні віварію не менше 7 днів. Щурів було розподілено на сім груп: 1 група – інтактні тварини; 2 група – щури, які отримували перорально водну суспензію NSE в дозі 50 мг/кг маси тіла протягом 7 діб, 3 група – щури, яким вводили внутрішньом'язово 0,1 мл олії мигдалю протягом 3 діб, 4 група – щури, яким вводили внутрішньом'язово протягом 3 діб перед забоєм розчин 17β -естрадіолу в олії мигдалю в дозі 400 мкг/кг маси тіла, 5 група – щури, яким вводили 17β -естрадіол на фоні NSE протягом останніх 3 діб перед забоєм, 6 група – щури, яким вводили перорально 0,2 мл олії мигдалю протягом 7 діб, 7 група – щури, яким вводили перорально вітамін Е в дозі 6 мг/кг маси тіла протягом 7 діб і 17β -естрадіол в дозі 400 мкг/кг маси тіла протягом останніх 3 діб перед забоєм. По закінченні експерименту всіх тварин було декапітовано під хлороформним наркозом, і кров тварин була зібрана у пробірки з гепарином. Після осадження еритроцитів в одержаній плазмі кількісно визначали вміст сумарних 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) спектрофлуориметричним методом [12]. Екстракцію стероїдних гормонів із плазми, в тому числі і тестостерону, проводили за методом [13]. Кількісне визначення цього гормону проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [14]. Інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів

(ПОЛ) у гомогенатах сім'яників вивчали за накопиченням вмісту ТБК-реагуючих продуктів – малонового діальдегіду (МДА) [15, 16], активність супероксиддисмутази (СОД) визначали як описано в роботі [17], активність каталази – методом [18]. Вміст протеїну визначали методом Лоурі [19]. Тканини щурів видаляли на льоду, визначали масу гіпоталамуса, аденогіпофіза, обох сім'яників та обох надниркових залоз. Статистичну обробку одержаних даних проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з використанням F-критерію Фішера та *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Опубліковані результати, які коротко розглянуто у вступі, показують, що ефект естрадіолу може реалізовуватися як на рівні аденогіпофізу, так і на рівні сім'яників. Представлені в таблиці дані свідчать, що 17β -естрадіол викликає збільшення маси сім'яників на 16%, можливо зумовленої розвитком запального процесу. N-стеароїлетаноламін, як і вітамін Е, попереджують це підвищення. Маса аденогіпофіза під впливом трьох ін'єкцій 17β -естрадіолу зменшується на 18% порівняно з інтактними тваринами, тоді як NSE або вітамін Е повністю попереджають це зниження, більш того маса аденогіпофіза в обох групах перевищує масу контрольних залоз (табл.). Дані літератури щодо зміни маси аденогіпофіза щурів-самців за введення їм естрадіолу суперечливі, в одному разі спостерігається її збільшення, в іншому – його маса не змінюється, що, на нашу думку, обумовлено використанням різних препаратів естрадіолу при проведенні експериментальних досліджень та різним віком тварин.

Вміст сумарних 11-гідроксикортикостероїдів у плазмі щурів, які отримували 17β -естрадіол, збільшується більше ніж в два рази порівняно з контролем, що може бути наслідком прямого впливу естрогену на кору надниркових залоз (рис. 1). Цей ефект естрогенів було вже описано раніше, причому він спостерігався як за введення естрогенів в організм, так і в дослідях *in vitro* [20]. Рівень кортикостероїдів не змінюється у разі введення NSE інтактним тваринам. Пероральне введення NSE або вітаміну Е щурам, які отримували 17β -естрадіол, зумовлює падіння рівня 11-ОКС порівняно з групою «естрадіол». Раніше нами було показано, що суміш NAE, яка містила ненасичені та насичені ацили, пригнічувала стероїдогенну дію 17β -естрадіолу *in vitro* і зни-

Вплив 17β-естрадіолу, NSE та вітаміну E на масу гіпоталамуса, аденогіпофіза, сім'яників та надниркових залоз щурів – самців ($M \pm m, n = 7-8$)

Інтактні тварини	NSE	Мигдалева олія в/м	17β-естрадіол в/м	NSE + 17β-естрадіол	Мигдалева олія per os	17β-естрадіол + вітамін E
1	2	3	4	5	6	7
<i>Гіпоталамус, мг</i>						
57,8 ± 3,9	63,5 ± 3,3	61,8 ± 2,3	62,8 ± 3,2	64,8 ± 3,1	64,9 ± 1,7	65,2 ± 2,4
<i>Аденогіпофіз, мг</i>						
6,8 ± 0,4	6,5 ± 0,8	7,7 ± 0,5	5,6 ± 0,2* [#]	9,9 ± 0,4* ^{#, &, @}	7,3 ± 0,5	8,7 ± 0,5* [@]
			* $P_{1-4} < 0,01$ # $P_{3-4} < 0,01$	* $P_{1-5} < 0,01$ # $P_{3-5} < 0,01$ & $P_{2-5} < 0,01$ @ $P_{4-5} < 0,01$		* $P_{1-7} < 0,05$ @ $P_{4-7} < 0,05$
<i>Сім'яники, г</i>						
2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1* ⁺	2,6 ± 0,1 [@]	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1 [@]
			* $P_{1-4} < 0,01$ + $P_{6-4} < 0,01$	@ $P_{4-5} < 0,01$		@ $P_{4-7} < 0,05$
<i>Надниркові залози, мг</i>						
153,9 ± 9,3	147,0 ± 5,6	142,4 ± 9,7	168,8 ± 11,8	156,0 ± 6,0	137,3 ± 8,8	156,2 ± 9,2

жувала вміст сАМР у тканині надниркових залоз [21, 22]. Яким є механізм дії вітаміну E на продукцію 11-ОКС важко припустити.

Введення 17β-естрадіолу самцям щурів спричинювало, як і передбачалось, різке зниження рівня тестостерону у крові щурів (рис. 2). NSE, як і вітамін E, істотно зменшує гальмуючий вплив 17β-естрадіолу на утворення тестостерону. Однією з можливих причин падіння секреції тестостерону може бути ушкоджуюча дія естрадіолу на сім'яники. Як показники ушкодження ми досліджували продукти, які реагують із тіобарбітуровою кислотою (рис. 3). Звертає на себе увагу суттєве зниження вмісту ТБК-реагуючих продуктів в тканині сім'яників щурів всіх груп, які отримували олію мигдалю. Захисний ефект олії мигдалю описано в низці клінічних досліджень [23, 24]. Нами вперше встановлено зниження олією мигдалю пероксидного окислення ліпідів у тканині сім'яників. Введення NSE підсилює дію олії мигдалю, і вміст ТБК-реагуючих продуктів у цьому разі є нижчим, ніж за використання вітаміну E. Ці дані свідчать, що 17β-естрадіол у використаній дозі і в терміни проведення експерименту не активує суттєво процеси пероксидації у тканині сім'яників щурів. Зниження вмісту ТБК-реагуючих сполук у групі 5 (рис. 3) беззаперечно обумовлене сумісним ефектом NSE та олії мигдалю.

Механізм цього ефекту вочевидь пов'язаний з активацією антиоксидантних ензимів. У цій групі спостерігається деяке підвищення активності супероксиддисмутази, яке можливо пояснює зниження рівня ТБК-реагуючих про-

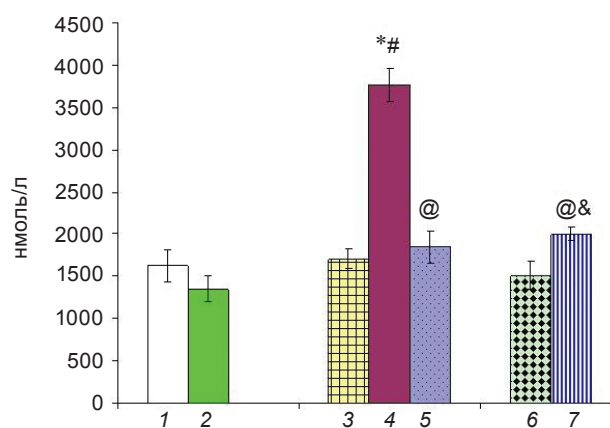


Рис. 1. Вплив NSE і вітаміну E на рівень сурмарних 11-гідроксикортикостероїдів у плазмі крові щурів за дії 17β-естрадіолу (E_2), $n = 7-8$: 1 – інтактні, 2 – NSE, 3 – мигдалева олія в/м, 4 – E_2 , 5 – NSE + E_2 , 6 – мигдалева олія per os, 7 – вітамін E + E_2 . Різниця вірогідна порівняно: * – з інтактними, # – з групою «мигдалева олія в/м», @ – з групою « E_2 », & – з групою «мигдалева олія per os», $P < 0,01$, F-критерій Фішера

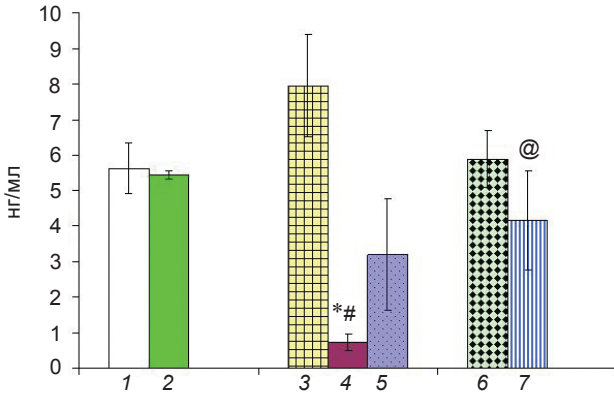


Рис. 2. Вплив NSE і вітаміну E на рівень тестостерону у плазмі крові щурів за дії 17β -естрадіолу (E_2), $n = 5-9$: 1 – інтактні, 2 – NSE, 3 – мигдалева олія в/м, 4 – E_2 , 5 – NSE + E_2 , 6 – мигдалева олія per os, 7 – вітамін E + E_2 . Різниця вірогідна порівняно: * – з інтактними, # – з групою «мигдалева олія в/м»; $P < 0,01$, @ – з групою « E_2 »; $P < 0,05$, t -критерій Стьюдента

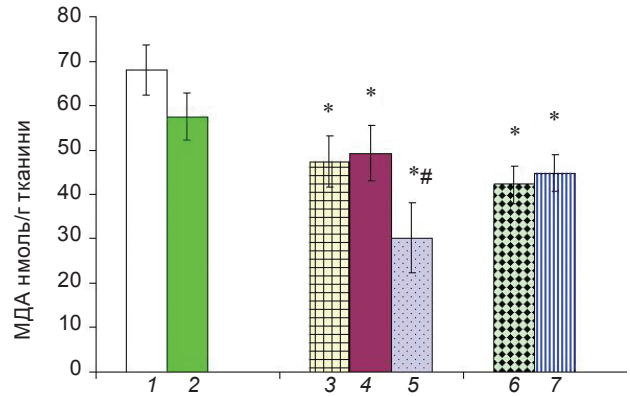


Рис. 3. Вплив NSE і вітаміну E на рівень ТБК-активних продуктів у сім'яниках щурів за умов дії 17β -естрадіолу (E_2), $n = 6-7$: 1 – інтактні, 2 – NSE, 3 – мигдалева олія в/м, 4 – E_2 , 5 – NSE + E_2 , 6 – мигдалева олія per os, 7 – вітамін E + E_2 . Різниця вірогідна в порівнянні: * – з інтактними, # – з групою «NSE», $P < 0,05$, F -критерій Фішера

дуктів у тканині (рис. 4). Збільшення активності ензиму спостерігається і в групі, яка отримувала вітамін E і 17β -естрадіол. Активація супероксиддисмутази в сім'яниках щурів, які отримували 17β -естрадіол на фоні NSE або вітаміну E може побічно свідчити про захисний ефект цих сполук, що обумовлює відсутність накопичення вмісту ТБК-реагуючих сполук в тканині сім'яників (рис. 3). Хоча активність каталази слабко зростає у тканині сім'яників

щурів, які отримували 17β -естрадіол на фоні NSE (рис. 5), в той самий час ці зміни також можуть свідчити про наявність активації антиоксидантного захисту за цих умов.

Таким чином, NSE і вітамін E попереджують різке зростання рівня 11-гідроксикортикостероїдів у крові самців щурів, які отримували 17β -естрадіол, і відновлюють нормальний рівень тестостерону у крові цих тварин. Встановлено зниження пероксидації ліпідів у

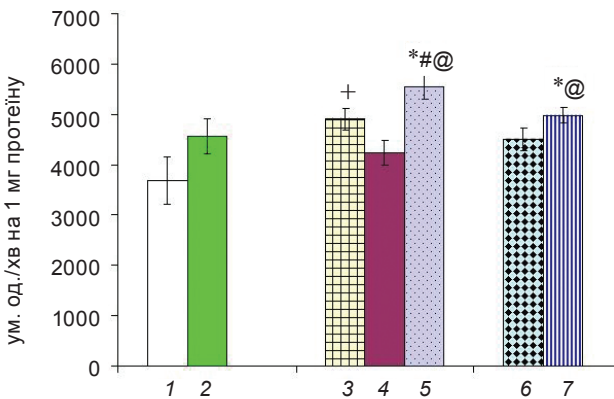


Рис. 4. Вплив NSE і вітаміну E на активність супероксиддисмутази в сім'яниках щурів за умов дії 17β -естрадіолу (E_2), $n = 7-8$: 1 – інтактні, 2 – NSE, 3 – мигдалева олія в/м, 4 – E_2 , 5 – NSE + E_2 , 6 – мигдалева олія per os, 7 – вітамін E + E_2 . Різниця вірогідна порівняно: * – з інтактними, # – з групою «NSE», @ – з групою « E_2 », + – з інтактними, $P < 0,05$, F -критерій Фішера

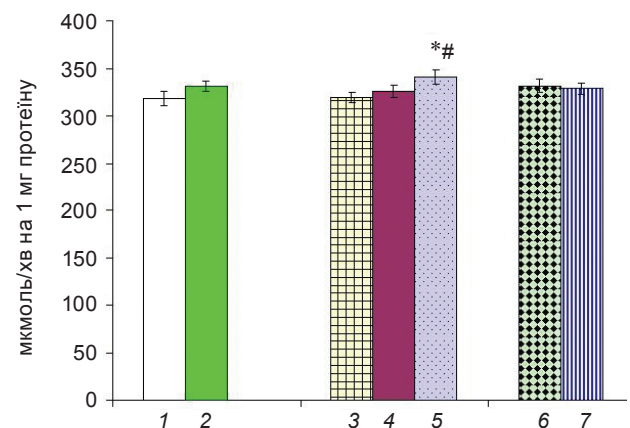


Рис. 5. Вплив NSE і вітаміну E на активність каталази в сім'яниках щурів за умов дії 17β -естрадіолу (E_2), $n = 7-8$: 1 – інтактні, 2 – NSE, 3 – мигдалева олія в/м, 4 – E_2 , 5 – NSE + E_2 , 6 – мигдалева олія per os, 7 – вітамін E + E_2 . Різниця вірогідна порівняно: * – з інтактними, # – з групою «мигдалева олія в/м», $P < 0,05$, F -критерій Фішера

сім'яниках олією мигдалю і потенціювання цього ефекту NSE. Як вітамін Е, так і NSE відновлюють масу аденогіпофіза, яка знижується під впливом 17 β -естрадіолу, причому дія NSE виявляється ефективнішою.

**МОДУЛИРОВАНИЕ
N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНОМ
ЭФФЕКТА 17 β -ЭСТРАДИОЛА
В ОРГАНИЗМЕ КРЫС-САМЦОВ**

*Н. М. Гулая, С. А. Шовкун,
Е. Н. Гринченко, Т. Н. Горидько,
А. Г. Бердышев, О. А. Барботько,
А. С. Микоша*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Исследовали влияние N-стеароилэтанол-амина (NSE) на уровень суммарных 11-гидрокси-кортикостероидов (11-ОКС) и тестостерона в плазме крови самцов крыс в норме и при трехдневном введении 17 β -эстрадиола в дозе 400 мкг/кг массы. Показано, что пероральное введение NSE интактным животным в течение 7 дней в дозе 50 мг/кг массы тела не вызывает изменения уровня 11-ОКС и тестостерона. При проведении эстрогенизации самцов крыс введение NSE предупреждает резкое повышение уровня 11-ОКС и нормализует уровень тестостерона в плазме крови. О возможности опосредованного влияния NSE на семенники через моделирование эффектов гормонов системы гипоталамус—гипофиз косвенно свидетельствует восстановление массы аденогипо-физа крыс, которая снижается под влиянием 17 β -эстрадиола. На уровне семенников эффект NSE при проведении эстрогенизации самцов крыс проявляется в торможении процессов пероксидного окисления липидов, а именно: в уменьшении содержания ТБК-реагирующих продуктов и увеличении активности энзимов антиоксидантной защиты супероксиддисмута-зы и каталазы. Следует отметить, что NSE проявляет более выраженный антиоксидант-ный эффект по сравнению с витамином Е, защищая клетки Лейдига семенников при повы-шении уровня эстрогенов в организме.

Ключевые слова: N-стеароилэтанол-амин, 17 β -эстрадиол, семенники, тестостерон, 11-гидрокси кортикостероиды, аденогипофиз, пероксидное окисление липидов, энзимы антиоксидантной защиты.

**THE MODULATION
OF N-STEAROYLETHANOLAMINE
EFFECT OF 17 β -ESTRADIOL
IN THE ORGANISM OF MALE RATS**

*N. M. Gula, S. A. Shovkun,
E. M. Grinchenko, T. M. Goridko,
A. G. Berdyshev, O. O. Barbotko,
O. S. Mikosha*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The influence of N-stearoylethanolamine (NSE) on total 11-hydroxycorticosteroids (11-HCS) and testosterone level in the blood of male rats in normal conditions and under the action of 17 β -es- tradiol (400 mkg/kg of body weight during 3 days) was studied. It was shown that NSE administra- tion per os (50 mg/kg of body weight during 7 days) to intact animals did not change the level of 11-HCS and of testosterone. The administra- tion of NSE to estrogenized male rats decreased the elevated level of 11-HCS and normalized the amount of testosterone in blood. The correction of altered weight of adenohipophysis and testis of estrogenized male rats compared to control can be a direct evidence of NSE-mediated modelling of the effect on hypothalamic-pituitary hormone sys- tem. The effect of NSE in the testis of estrogenized male rats inhibited the process of lipid peroxida- tion, caused the decrease of the amount of thiobar- bituric acid reactive substances and increased the activity of superoxide dismutase and catalase. The NSE showed more expressed antioxidative effect compared to vitamin E. Taking into consideration all above mentioned data we suggested that NSE administration to male rats protected Leydig cells from damage under the increase of estrogen level.

Key words: N-stearoylethanolamine, 17 β -estradiol, testis, testosterone, 11-hydroxycor- ticosteroids, adenohipophysis, lipid peroxidation, antioxidative enzymes.

1. Wenger T., Ledent C., Csernus V., Gerendai I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – 284, N 2. – P. 363–368.
2. Wenger T., Toth B. E., Juaneda C. et al. // Life Sci. – 1999. – 65, N 6–7. – P. 695–701.
3. Gonzales S., Bisogno T., Wenger T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – 270, N 1. – P. 260–266.

4. Scorticati C., Fernandez-Solari J., De Laurentiis A. et al. // PNAS. — 2004. — **101**. — P. 11891–11896.
5. Schuel H., Burkman L. J. // Biology reproduction. — 2005. — **73**. — P. 1078–1086.
6. Maccarrone M. // Br. J. Pharmacology. — 2008. — **153**, N 2. — P. 189–198.
7. Kondo S., Sugiura T., Kodaka T. et al. // Arch. Biochem. Biophys. — 1998. — **354**. — P. 303–310.
8. Cline J. M., Franke A. A., Register T. C. et al. // Toxicologic Pathology. — 2004. — **32**, N 1. — P. 91–99.
9. Chavarro J. E., Toth T. L., Sadio S. M., Hausser R. // Human Reproduction. — 2008. — **23**, N 11. — P. 2584–2590.
10. Akingbemi B. T., Braden T. D., Kemppainen B. W. et al. // Endocrinology. — 2007. — **148**, N 9. — P. 4475–4488.
11. Tsai-Morris C. H., Knox G., Luna S., Dufau M. L. // J. Biol. Chem. — 1986. — **261**. — P. 3471–3474.
12. Балашов Ю. Г. // Физиол. журн. СССР. — 1990. — **76**, № 2. — С. 280–283.
13. Богдарин Ю. А. // Проблемы эндокринологии. — 1978. — № 5. — С. 48–52.
14. Количественный анализ хроматографическими методами / Под ред. Э. Кэца. — М.: Мир, 1990. — 76 с.
15. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
16. Мельничук С. Д., Кузьменко А. И., Маргутич В. М. и др. // Укр. биохим. журн. — 1998. — **70**, № 1. — С. 87–94.
17. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. // Лаб. дело. — 1991. — № 10. — С. 9–13.
18. Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Там же. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
19. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**, N 1. — P. 265–275.
20. Гринченко Е. М., Ковзун Е. И., Микоша А. С. // Укр. біохім. журн. — 2006. — **78**, № 5. — С. 88–92.
21. Сторожук Л. М., Грінченко Є. М., Шовкун С. А. та ін. // Тези доповідей VII з'їзду ендокринологів України / Київ, 15–18 травня 2007 р. — К.: 2007. — С. 274.
22. Ковзун О. І., Левчук Н. І., Гула Н. М., Микоша О. С. // Укр. біохім. журн. — 2007. — **79**, № 5. — С. 133–139.
23. Jenkins D. J. A., Kendall C. W. C., Marchie A. et al. // J. Nutr. — 2008. — **138**. — P. 908–913.
24. Hyson D. A., Schneeman B. O., Davis P. A. // Ibid. — 2002. — **132**. — P. 70–707.

Отримано 22.03.2010