

УДК 577.17.612.4

ФИЗИОЛОГИЯ

Е. И. ЧАЗОВ, В. А. ИСАЧЕНКОВ, О. Г. КРИВОШЕЕВ,
С. И. ВЕСЕЛОВА, Г. В. ЖИВОДЕРОВА

**ФАКТОР ИЗ ЭПИФИЗА, ИНГИБИРУЮЩИЙ ОВУЛЯЦИЮ,
ИНДУЦИРОВАННУЮ ЛЮТЕИНЕЗИРУЮЩИМ ГОРМОНОМ**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 17 VII 1972)

В целом ряде сообщений приводятся данные, указывающие на ингибирующее влияние эпифиза на функцию репродуктивных органов. Так, например, удаление эпифиза у инфантильных крыс ускоряет развитие гонад и приводит к более раннему наступлению половой зрелости (¹, ²). Известно, что содержание крыс и хомяков в темноте вызывает снижение веса яичников. В то же время удаление эпифиза предупреждает этот эффект (³, ⁴). Односторонняя овариоэктомия или орхеоэктомия у крыс с удаленным эпифизом обеспечивает более интенсивную компенсаторную гипертрофию оставшихся гонад (⁵).

Механизм антигонадного действия эпифиза (пинеальной железы) остается невыясненным. В целом эндокринные эффекты эпифиза на половые железы противоположны действию на них гонадотропных гормонов гипофиза. В своих исследованиях мы исходили из предположения что эпифиз секретирует физиологически активные начала, ингибирующие действие гонадотропных гормонов в органах-мишенях. Опыты, излагаемые в настоящей работе, имели цель проверить это предположение. Эксперименты показали, что один из выделенных нами препаратов из ткани эпифиза способен ингибировать такое известное специфическое действие лютеинизирующего гормона гипофиза, каким является индуцирование овуляции яйцеклеток из зрелых фолликул.

Материалы и методика. Крысам-самкам линии Вистар на 25-й день жизни утром вводили подкожно 12 единиц сыворотки жеребых кобыл (СЖК). Эта доза СЖК достаточна для созревания яйцеклеток, но недостаточна для их спонтанной овуляции (⁶). Через 50 час. группе контрольных крыс внутривенно вводили 0,5 мл физиологического раствора, а группам опытных крыс — по 300 мкг препарата из эпифизов в 0,5 мл физиологического раствора. Через 2 часа после этого контрольным крысам вводили в хвостовую вену 3 мкг лютеинизирующего гормона (ЛГ), растворенного в 0,5 мл физиологического раствора, а опытным в том же объеме 3 мкг ЛГ и 300 мкг исследуемого препарата из эпифизов. Через 20 час. после введения ЛГ крыс забивали, извлекали оба яичника и отделяли яйцеводы. Расправленные яйцеводы помещали между двумя предметными стеклами и подсчитывали в них число яйцеклеток под микроскопом при 40-кратном увеличении.

Для получения препарата, ингибирующего овуляцию, использовали свежемороженые эпифизы крупного рогатого скота. Из них готовили ацетоновый порошок. Ацетоновый порошок экстрагировали 0,05 М бикарбонатом аммония pH 9,5 (75 г порошка на 1 л буфера) в течение 2 час. Материал центрифугировали при 20 000 g 30 мин., осадок отбрасывали, а надосадочный раствор лиофилизировали. 10 г высушенного экстракта суспензировали в 100 мл 0,02 М уксуснокислого аммония pH 7,4 и перемешивали при 4° 2 часа. К раствору добавляли холодный этиловый спирт

(-10°) — до 60% по объему. Через 3 часа суспензию центрифугировали при 6000 g 20 мин. Обильный осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость после отгонки из нее спирта в вакууме лиофилизировали. Высушенный материал перерастворили в 100 мл 0,02 M ацетата аммония и прибавляли сульфат аммония до 50% насыщения. Через 4 часа смесь центрифугировали при 10 000 g 45 мин. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости прибавляли твердую соль сульфата аммония до 100% насыщения. Материал оставляли на холоду и через 12 час. центрифугировали при 10 000 g 45 мин. Желтый надосадочный раствор отбрасывали, осадок перерастворили в небольшом объеме 0,02 M ацетата аммония. Дальнейшую очистку этого препарата проводили гельфильтрацией на колонке с Сефадексом Г-50. Размер колонки 2,5 $\times$ 100 см. Элюция 0,02 M ацетатом аммония со скоростью 100 мл/час. Объем фракций 5 мл. Фракции, разделенные гельфильтрацией, лиофилизировали и отдельно тестировали.

Результаты. Щелочной экстракт из ацетонового порошка эпифизов после его предварительного фракционирования этиловым спиртом и сульфатом аммония разделяется на колонке с Сефадексом Г-50 на пять фракций (рис. 1). Деление вещества на Сефадексах основано на принципе молекулярных сит, т. е. вещества разделяются главным образом по размерам молекул. Следовательно, пять фракций, полученных гельхроматографией материала из эпифиза, различаются по величине молекулярного веса.

Результаты, полученные после испытания действия этих фракций на овуляцию, суммированы в табл. 1.

Как следует из данных табл. 1, введение инфантильным крысам 12 ед. СЖК не вызывает овуляции.

У крыс контрольной группы, обработанных СЖК и лютеинизирующим гормоном, овуляция зафиксирована у всех 14 животных. Овуляция резко тормозится при совместном введении лютеинизирующего гормона и фракции I эпифиза. Из 15 крыс этой группы овулировали только две. Потенция ингибировать овуляцию у фракций, полученных после гельхроматографии на Сефадексе, ослабляется по мере снижения их молекулярного веса. Фракция II, как соседняя с фракцией I, еще блокирует овуляцию более чем у половины крыс. Фракции III, IV практически лишены антиовуляторного действия.

Таким образом, результаты этих опытов показывают, что в эпифизе содержится физиологически активный фактор, способный блокировать индуцируемую лютеинизирующим гормоном гипофиза овуляцию яйцеклеток в яичниках инфантильных крыс, предварительно обработанных СЖК. Использование для доказательства этого эффекта инфантильных крыс и экзогенных гонадотропинов представляло, на наш взгляд, наиболее подходящую модель.

Осуществление овуляции яйцеклеток из зрелых фолликулов считается одной из специфических функций лютеинизирующего гормона. В связи с этим в названии лютеинизирующего гормона в последние годы все чаще применяется синоним — «гормон овуляции». Однако лютеинизирующий гормон, по-видимому, лишь запускает в яичниках цепь биохимических ре-

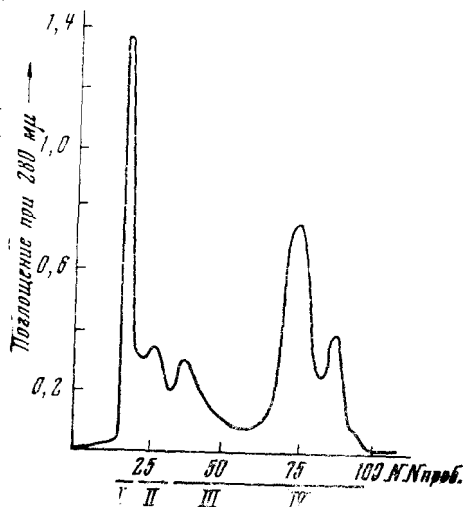


Рис. 1. Гель-хроматография на колонке с сефадексом Г-50 препарата из эпифиза, полученного фракционированием щелочного экстракта этанолом и сульфатом аммония

акций, приводящих к овуляции. На первом этапе этот гормон взаимодействует с рецепторами клеток яичника, наличие которых уже доказано ⁽⁷⁾. Вслед за этим в яичниках происходят процессы, затрагивающие нуклеиновый и белковый метаболизм, а также стероидогенез прогестиннов. На такую последовательность событий указывают данные, в которых установлено, что актиномицин Д ⁽⁸⁾, пуромицин ⁽⁹⁾ и ингибиторы стероид дегидрогеназ ⁽¹⁰⁾ могут полностью блокировать овуляцию, вызываемую лютеинизирующим гормоном.

Таблица 1
Эффект препаратов из эпифиза на овуляцию

Воздействие	Число крыс	Число яйцеклеток на одно животное	Число овулировавших (над чертой) и неовулировавших крыс
СЖК	6	0	0/6
СЖК + ЛГ	14	6,6 ± 0,78	14/0
СЖК + ЛГ + фр. I	15	0,7 ± 0,49	2/13
СЖК + ЛГ + фр. II	14	2,2 ± 1,13	5/9
СЖК + ЛГ + фр. III	6	6,0 ± 1,78	5/1
СЖК + ЛГ + фр. IV	6	5,8 ± 1,42	6/0

Поскольку овуляция представляет собой многоэтапный процесс, пока трудно определить точку приложения полученного нами из эпифиза фактора, блокирующего овуляцию. Можно лишь предполагать, что фактор, который мы обозначили рабочим названием «ановулин», способен либо конкурировать с лютеинизирующим гормоном за общие рецепторы ткани яичника, либо ингибировать те специфические изменения в метаболизме овариальной ткани, которые индуцируются лютеинизирующим гормоном и в конечном счете приводят к овуляции яйцеклеток. Каков бы ни был механизм действия этого фактора, в настоящее время мы четко определяем его физиологическое действие, заключающееся в ингибировании овуляции яйцеклеток.

Мы проводим дальнейшую работу по выяснению механизма действия ановулина. Следует отметить, что он имеет относительно высокий молекулярный вес, так как элюируется при гельфильтрации через колонку с Сефадексом Г-50 после сравнительно небольшого объема буфера. Ановулин имеет, по-видимому, белково-пептидную природу. В дополнительных опытах было обнаружено, что после протеолиза фактора трипсином его антиовуляторное действие утрачивается.

Центральная научно-исследовательская лаборатория
Четвертого главного управления
при Министерстве здравоохранения СССР
Москва

Поступило
11 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Relkin, Endocrinology, 82, 1249 (1968). ² R. J. Wurtman, J. Axelrod, D. Kelly, The Pineal Gland, N. Y.—London, 1968. ³ R. J. Reiter N. M. Ellison, Biol. Rep., 2, № 2, 216 (1970). ⁴ R. J. Reiter, Experientia, 26, 1153 (1970). ⁵ K. Dickson, B. Beunson, J. C. Tate, Acta endocrinol., 66, 177 (1971). ⁶ A. S. Goldman, W. C. Yakovac, A. M. Bongiovanni, Endocrinology, 77, 1105 (1965). ⁷ C. Y. Lee, R. J. Ryan, Endocrinology, 87, 1515 (1971). ⁸ W. R. Pool, H. Lipner, Nature, 203, 1385 (1964). ⁹ W. R. Pool, H. Lipner, Endocrinology, 79, 858 (1966). ¹⁰ H. Lipner, R. O. Greep, Endocrinology, 88, 602 (1971).