

УДК 636.22/.28: [612.018+612.118

## СОДЕРЖАНИЕ КОРТИЗОЛА И 17 $\beta$ -ЭСТРАДИОЛА И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ТЕЛЯТ В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Н. А. ЭПШТЕЙН, К. Е. ЭДЕЛЬ

(Кафедра молочного и мясного скотоводства)

В настоящее время хорошо известна важная роль стероидных гормонов, секретируемых корой надпочечников и половыми железами, в регуляции роста и развития млекопитающих, в т. ч. крупного рогатого скота, их репродуктивных функций, а также в осуществлении адаптационных реакций [17].

Стероидные гормоны оказывают большое влияние на естественную резистентность и иммунитет животных [15]. Установлена, в частности, определенная взаимосвязь между показателями резистентности у телят (содержание  $\gamma$ -глобулинов, комплемента, лизоцима, фагоцитарная активность) и концентрацией кортизола и 17  $\beta$ -эстрадиола в крови [10]. Имеется положительный опыт использования этих гормонов и их синтетических аналогов для профилактики и лечения незаразных болезней молодняка [1].

Несмотря на использование в последнее время высокоспецифических методов радиоиммунного и иммуноферментного анализа, пока еще нет достаточно надежных данных о динамике содержания стероидных гормонов в крови телят в норме при различных условиях выращивания, а также при экстремальных состояниях, особенно в ранний, наиболее ответственный период онтогенеза. Нами наряду с изучением этого вопроса исследовались параметры комплексирования кортизола и 17  $\beta$ -эстрадиола с белками сыворотки крови, поскольку физиологическая эффективность действия стероидов зависит не только от их концентрации в сосудистом русле, но и от характера взаимодействия с транспортными макромолекулами [7], влияющего на скорость метаболизма гормонов.

### Материал и методы

Опыт проводили в ГПЗ «Заря коммунизма» Домодедовского района Московской области летом 1984 г. на 15 телках черно-пестрой породы, аналогах по времени рождения и живой массе.

Телок после рождения помещали в индивидуальные клетки, где содержали до 10-дневного возраста, затем их переводили в групповые клетки (по 5 гол. в каждой). С месячного возраста и до окончания опыта животные содержались в групповых клетках (по 10 гол.) в телятнике.

Первую порцию молозива (~1 л) телки получали через 1 ч после рождения. Дальнейшее кормление проводилось по схеме, принятой в хозяйстве и рассчитанной на получение 800 г среднесуточного прироста. За 3 мес выращивания животным скормлено в расчете на 1 гол. 350 кг цельного молока и 40 кг ЗЦМ.

Из подопытных животных были сформированы три группы, по 5 гол. в каждой. Контролем служила 1-я группа. Телкам 2-й группы в 1, 2-е и 3-и сутки перорально вводили соответственно 0,03; 0,02 и 0,01 мг этинил-эстрадиола (синтезирован во ВНИХФИ) в смеси с молозивом двукратно

(утром и вечером) в равной дозе. Телки 3-й группы наряду с этинил-эстрадиолом, вводимым по схеме, принятой для 2-й группы, получали на 2-е, 3-и и 4-е сутки соответственно по 5; 2,5 и 1,25 мг фармакопейного препарата преднизолона, который вводили перорально с молозивом дважды в день (утром и вечером) в равных дозах.

У всех телок пункцией *v. jugularis* брали образцы крови сразу после рождения (до 1-й выпойки молозива), затем к концу 1, 3 и 10-х сут и в 1- и 3-месячном возрасте. После отстаивания при комнатной температуре в течение 12 ч образцы центрифугировали, полученную сыворотку расфасовывали в полиэтиленовые пробирки, закрывали пробками и помещали в жидкий азот, где хранили их до исследований. В образцах определяли содержание кортизола и 17  $\beta$ -эстрадиола радиоиммунологическим методом, используя наборы (киты) фирмы CIS (Италия). Радиоактивность образцов измеряли в лаборатории кафедры прикладной атомной физики и радиохимии Тимирязевской академии на счетчике Компью-Гамма (ЛКБ), концентрацию стероидов (в нг/мл и пг/мл) рассчитывали

по стандартной кривой. Во всех пробах определяли содержание общего белка и его фракций электрофорезом в агаровом геле (мединал-вероналовый буфер, рН 8,6; сила тока 1 мА на 1 см фронта).

Комплексообразование стероидных гормонов с белками сыворотки крови определяли с помощью меченных по тритию соединений: эстрадиол-6,7-<sup>3</sup>H (ЛМО «Изотоп», СССР, удельная активность 48 Ки/мМоль) и 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-кортизол («Амершам», Англия, удельная активность 85 Ки/мМоль).

Меченые кортизол и 17 β-эстрадиол предварительно очищали на колонках с сефадексом LH-20 (элюирующая смесь толуол-метанол соответственно в соотношении 75:25 и 85:15). Образцы исследуемой сыворотки (250 мкл) инкубировали с мечеными стероидами (20 000 имп/мин на пробу) 30 мин при 37°, затем оставляли на ночь в холодильной камере при 4° для уравнивания.

Для разделения свободных и связанных с белком форм гормонов использовали метод гель-фильтрации, предложенный Де Муром и соавторами [13]. С этой целью 50 мкл сыворотки с внесенной меткой наносили на предварительно откалиброванные по белку стеклянные колонки (4×70 мм), заполненные сефадексом Ж-50 тонкого зерна (Фармация, Швейцария), и элюировали при температуре 18° фосфатным буфером (рН 7,4; М 0,15), приготовленным на физиологическом растворе. Для лучшего визуального контроля за процессом разделения в каждую пробу добавляли 1 мкл 10 % водного раствора гемоглобина, полученного гипотоническим лизированием отмытых эритроцитов крупного рогатого скота. Как показали предварительные исследования, изменения процента связывания стероидов, обусловленные внесением в образцы раствора гемоглобина, не превышали 0,1 %.

Белковый элюат (~0,3 мл) собирали в градуированные пробирки, доводили элюентом до 0,5 мл, затем переносили алквоту во флаконы для счета. Радиоактивность образцов измеряли в диоксановом сцинтилляторе (Унисольв) на β-спектрометре Рак-Бета (ЛКБ, Швеция).

Величину связывания стероидов с белком определяли как соотношение радиоактивности, нанесенной на колонку ( $A_c$ ) и собранной с белковым элюатом ( $A_6$ ):

$$\frac{A_6}{A_c} \times 100 (\%).$$

Для оценки емкости специфических транспортных белков по отношению к кортизолу и 17 β-эстрадиолу рассчитывали процент связывания стероидов с белком при внесении в образцы (100 мкл) наряду с <sup>3</sup>H-стероидом 10 нг соответствующего немеченого стероида. Пробы инкубировали 30 мин при 37° и оставляли для уравнивания в течение 2 ч при 4°. Аликвоту сыворотки (50 мкл) наносили на колонку с сефадексом Ж-50, затем проводили разделение свободных и связанных форм стероидов, как описано выше.

Параметры специфического связывания с комплексообразующими белками сыворотки крови определяли ме-

тодом твердофазной адсорбции на активированном угле, покрытом декстраном [2]<sup>1</sup>.

Из образцов сыворотки крови предварительно удаляли эндогенные стероиды. Для этого 1 мл сыворотки смешивали с 0,5 мл 4 % взвеси активированного угля (Норит А), покрытого декстраном, 80, в фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 10 объемных % глицерина и 0,33 М сахарозы.

Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°. Уголь с адсорбированными на нем стероидами осаждали центрифугированием при 4° (5 мин, 3000 г), что позволяет удалить практически все эндогенные стероиды из образцов без инактивации специфических транспортных белков.

Бесстероидную сыворотку (20 мкл) инкубировали с соответствующим меченым гормоном (10 000 имп/мин) в отсутствие, а также с добавкой немеченого стероида (1, 2, 4, 8, 16, 100 нг на пробу). Общий объем инкубационной смеси доводили буфером до 125 мкл и инкубировали на ледяной бане 1,5 ч. К смеси добавляли 25 мкл 4 % угольно-декстрановой смеси, встряхивали, инкубировали 3 мин, затем центрифугировали при 4° (5 мин, 3000 г); 100 мкл супернатанта переносили во флаконы для счета и определяли радиоактивность, как описано выше<sup>2</sup>.

Экспериментальные данные о вытеснении меченого гормона (в процентах) из комплекса с белком разными дозами немеченых добавок наносили на график, построенный в координатах Скэтчарда [21], откладывая по оси абсцисс данные о количестве связанного гормона ( $B$ ), а по оси ординат — значения соотношения связанной и свободной форм гормона ( $B/U$ ). Эмпирические точки линеаризировали по методу наименьших квадратов, полученные прямые экстраполировали до пересечения с осями графика и исходя из уравнения Скэтчарда

$$B/U = K_a(N - B)$$

определяли равновесную константу ассоциации  $K_a (M^{-1})$  и молярную концентрацию связывающих участков комплексообразующего белка ( $N$ ).

Результаты исследований подвергнуты статистической обработке по методу малых выборок. Для определения достоверности разности между средними величинами использовали критерий  $t_d$  Стьюдента (по Н. А. Плехинскому). Корреляционный анализ данных проводили на ЭВМ ЕС-1022 в ЭВЛ ТСХА.

<sup>1</sup> Авторы выражают глубокую благодарность заведующему лабораторией эндокринологии МГУ проф. В. Б. Розену за предоставленную возможность выполнить этот этап исследований в его лаборатории, а также ст. научному сотруднику А. Н. Смирнову за методическую помощь при проведении работы и участие в обсуждении ее результатов.

<sup>2</sup> Данная методика была использована только для изучения комплексообразования кортизола, так как из-за высокой лабильности эстрадиол-белкового комплекса не удалось добиться его стабилизации во времени — комплексы разрушались уже при минутной инкубации с углем.

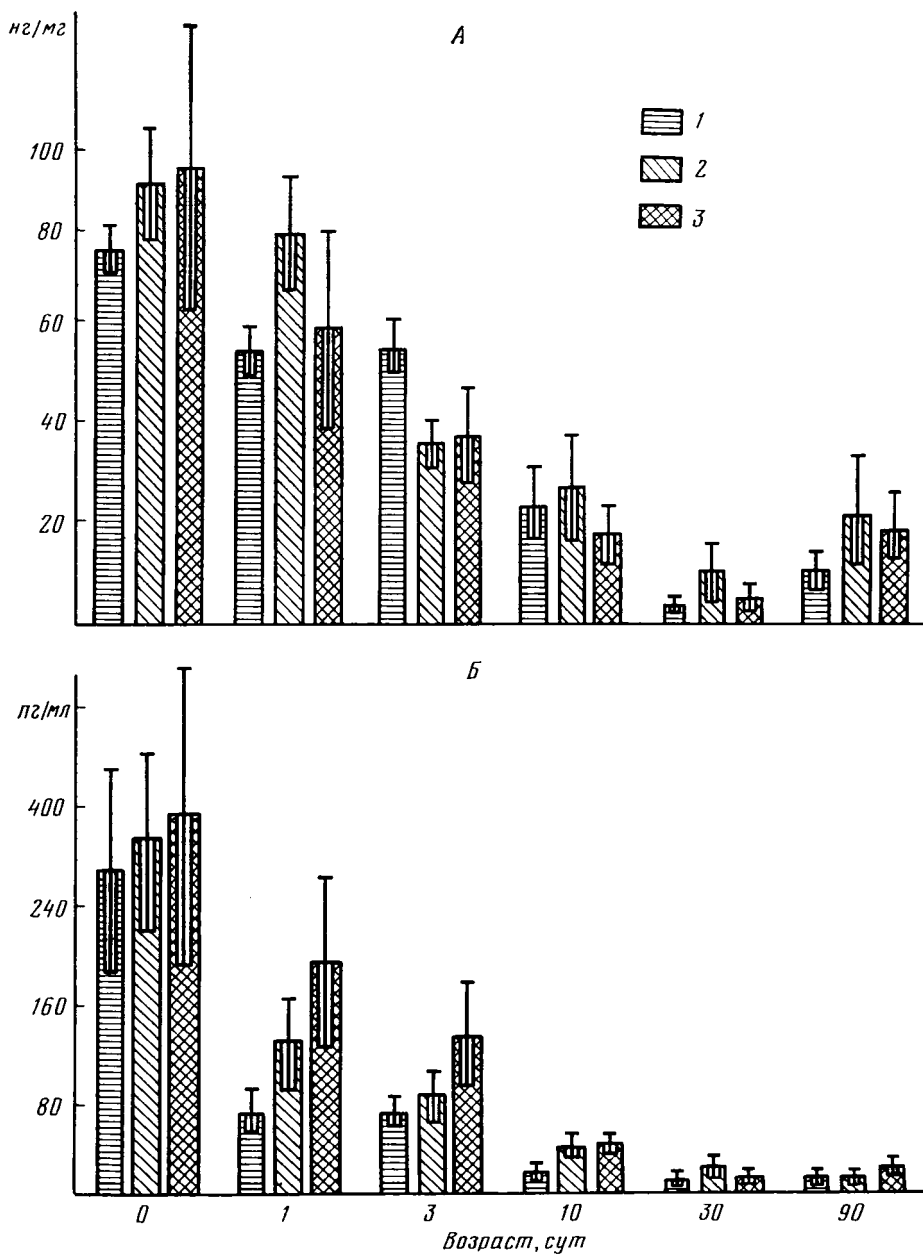


Рис. 1. Возрастная динамика уровня кортизола (А) и 17β-эстрадиола (Б) в сыворотке крови телок.

1, 2, 3 — соответственно группы животных.

### Результаты и обсуждение

Результаты радиоиммунологического определения содержания кортизола и 17β-эстрадиола в сыворотке крови подопытных животных представлены на рис. 1. Концентрация кортизола в сыворотке крови телок при рождении была максимальной (78,5—95,4 нг/мл), в месячном возрасте она снизилась до минимума (5,9—11,9 нг/мл) и к 3-му месяцу несколько увеличилась (10,9—23,0 нг/мл).

Изменение концентрации кортизола с возрастом наиболее точно описывается уравнением параболы вида  $y=114,2-26,5t+0,98t^2$ , где  $t$  — возраст телок в днях. Об аналогичной динамике содержания кортизола у телят сообщают М. Боск и Ж. Февр [11].

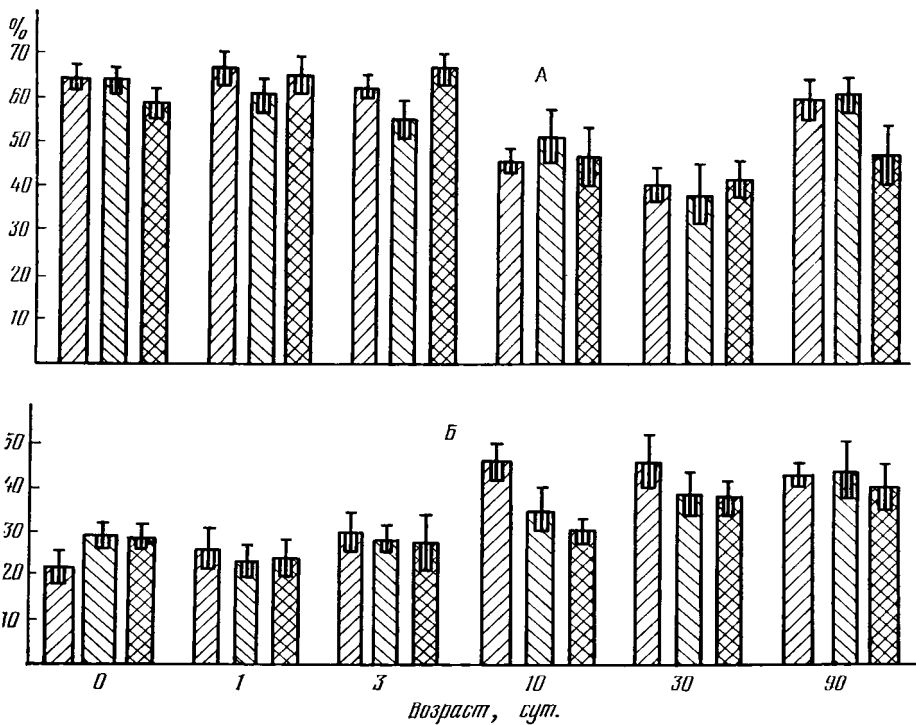


Рис. 2. Процент связывания стероидных гормонов с белками сыворотки крови у телок.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Высокий уровень кортизола у телят при рождении принято рассматривать [24] как результат реакции коры надпочечников новорожденного животного на стресс, связанный с родовым актом.

При пероральном введении этинил-эстрадиола уровень кортизола у телок 2-й группы увеличился в 1-е сутки после рождения (на 43,0 % больше, чем в контроле). Это согласуется с представлением о том, что эстрогены могут вызывать гипертрофию надпочечников и стимулировать биосинтез кортикостероидов, действуя как трансгипофизарно, так и непосредственно на надпочечники, повышая их чувствительность к АКТГ [20]. На 3-и сутки уровень кортизола у телок, получивших этинил-эстрадиол и преднизолон, был существенно ниже, чем у контрольных животных ( $P < 0,05$ ). У телок, получавших этинил-эстрадиол с преднизолоном (3-я группа), понижение уровня кортизола сохранялось и в 10-дневном возрасте, что обусловлено, по всей вероятности, депрессорным влиянием введенного кортикостероида на эндогенную продукцию кортизола.

Еще более резко выражена у телок возрастная динамика уровня  $17\beta$ -эстрадиола в крови. В течение первых суток концентрация стероида в крови снижалась в 3—4 раза по сравнению с его уровнем при рождении (275,8—322,6 пг/мл). Дальнейшее уменьшение содержания гормона, продолжавшееся до 1—3-месячного возраста (8,9—25,1 пг/мл), происходило уже более плавно. Таким образом, снижение концентрации  $17\beta$ -эстрадиола в сыворотке крови с возрастом носит экспоненциальный характер и может быть описано уравнением  $y = 10^{2,8 - 0,36t}$ . Высокая концентрация  $17\beta$ -эстрадиола в крови у новорожденных телят, по-видимому, связана с эстрогенной насыщенностью организма коров-матерей в последний период стельности [3], так как эстрогены способны проходить через плацентарный барьер.

Введение этинил-эстрадиола и особенно его комплекса с преднизолоном повысило уровень  $17\beta$ -эстрадиола в крови у подопытных животных по сравнению с контрольными (в 1-е сутки — в 2,0—3,0 раза, на 3-и — в 1,3—2,1 раза).

В целом полученные данные подтверждают представление о высокой гормональной насыщенности сыворотки крови новорожденных животных. Резкое снижение уровня стероидных гормонов в 1-е часы и дни жизни телок является характерной особенностью их эндокринной регуляции в ранний постнатальный период.

Данные о связывании стероидов с белками сыворотки крови, полученные с помощью метода гель-фильтрации, представлены на рис. 2. Принято считать [5], что метод гель-фильтрации позволяет определять только относительно прочные комплексы, такие, как транскортин-кортизоловый (транскортин-специфический, обладающий высоким сродством к кортикостероидам белок, относящийся к  $\alpha_1$ -гликопротеидам с константой седиментации  $3s$  и молекулярной массой 52 000—53 000), менее прочные кортизол-альбуминовые комплексы в процессе гель-фильтрации диссоциируют.

Наиболее высокий процент связывания кортизола (61,0—66,9) наблюдался у телок в 1—3-и сутки после рождения, к 10—30-дневному возрасту он существенно снижался (до 39—52) и вновь несколько возрастал у животных 3-месячного возраста (47,8—61,4).

Следует отметить, что величина связывания кортизола, а также его суммарная концентрация в плазме крови телят значительно ниже, чем у человека ( $221,0 \pm 9,6$  нг/мл, в т. ч. связанного кортизола  $154,0 \pm 8,8$  нг/мл [6]) и большинства экспериментальных животных [22]. Поэтому представляет интерес вопрос о взаимосвязи концентрации кортизола (а также других стероидов) и связывающей способности плазменных белков со скоростью метаболизма этих гормонов.

По данным Де Мура [12], период, в течение которого концентрация введенного гидрокортизона  $-4\text{-}^{14}\text{C}$  в крови крупного рогатого скота снижается в 2 раза ( $T_{1/2\text{биол}}$ ) составляет 26,5 мин, или около 1/4 времени, необходимого для человека, 1/2 — для собаки и 1/5 — для морской свинки. У овец период  $T_{1/2\text{биол}}$  еще более короткий [14]. Таким образом, данные о низкой связывающей способности белков сыворотки крови у телят, а также у взрослых животных вида *Bos* [9] хорошо согласуются с повышенной скоростью метаболизма кортикостероидов у жвачных.

Введение телкам этинил-эстрадиола не вызвало, как этого можно было ожидать на основании литературных данных [20], усиления взаимодействия кортизола со связывающими белками. Напротив, оно обусловило даже некоторое снижение процента связывания гормона по сравнению с контролем, особенно на 3-и сутки. При введении телкам эстроген-кортикостероидного комплекса процент связывания кортизола увеличился. Возможно, в этом проявилась буферная роль комплексообразующих белков, нейтрализующих повышенное количество кортикостероидов в крови телят, обусловленное введением им преднизолонa.

Процент связывания  $17\beta$ -эстрадиола сывороточными белками при аналогичных условиях разделения значительно ниже, чем кортизола (22,4—46,8). Наименьший процент связывания (23,1—26,1) стероида отмечался у телок в 1-е сутки. К 10-дневному возрасту этот показатель повысился (до 31,4—46,8 %) и до 3 мес оставался практически на одном уровне. У телок 2-й и 3-й групп процент связывания  $17\beta$ -эстрадиола в большинстве периодов опыта был ниже, чем у контрольных животных. Полученные данные следует, по-видимому, интерпретировать с учетом взаимосвязи между комплексированием гормонов и скоростью их метаболизма, что позволяет объяснить механизм ускоренного выведения  $17\beta$ -эстрадиола из организма телок в первые часы и дни их жизни.

Несколько иная возрастная динамика концентрации связанных с белком стероидов в сыворотке крови (рис. 3). Концентрация связанных форм кортизола и  $17\beta$ -эстрадиола наибольшая у новорожденных телок (соответственно 50,2—58,4 нг/мл и 46,5—92,8 пг/мл). С возрастом уровень связанных форм гормонов в сыворотке крови и особенно  $17\beta$ -эстрадиола снижается.

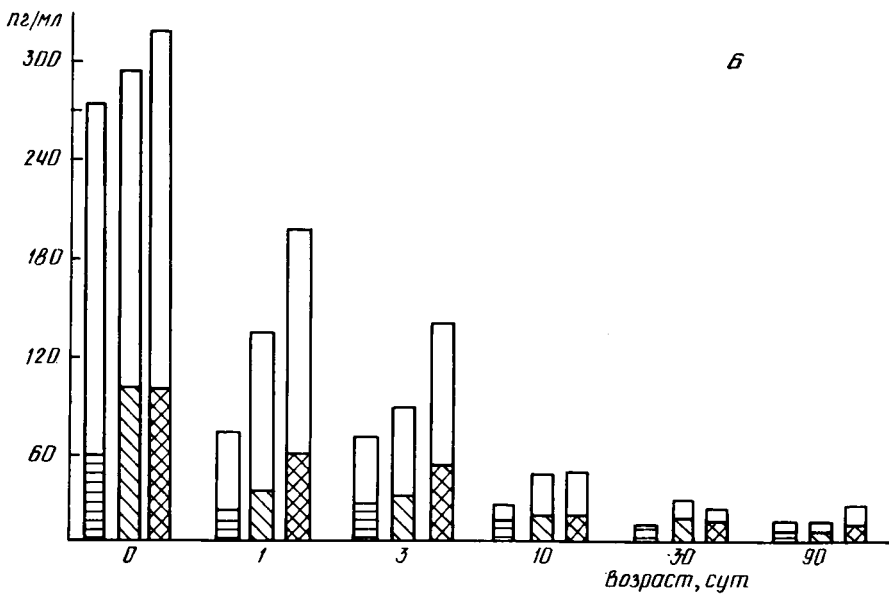
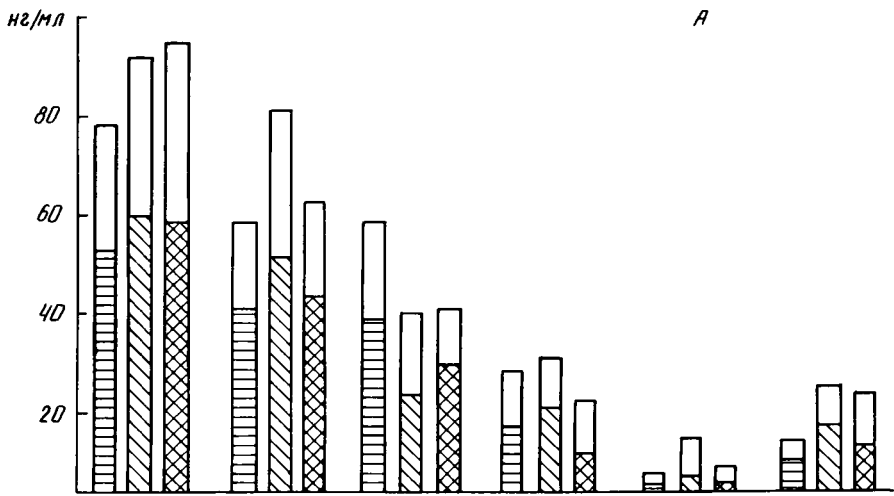


Рис. 3. Концентрация свободных и связанных (заштриховано) форм гормонов и их соотношение в сыворотке крови у телят. Обозначения те же, что на рис. 1.

Под влиянием перорального введения этинил-эстрадиола и его комплекса с преднизолоном уровень связанного кортизола в крови телок на 3-и сутки был ниже, чем у контрольных, в то время как содержание связанного с белком  $17\beta$ -эстрадиола, напротив, значительно выше (в 1,5—3 раза).

Анализ приведенных на рис. 3 данных показывает, что в случае кортизола более выражено изменение содержания в крови связанных с белком форм, в случае  $17\beta$ -эстрадиола — свободных.

Известно [7], что стероидные гормоны в крови человека и животных могут комплексоваться с различными транспортными белками, причем набор белков и их характеристики могут значительно различаться в зависимости от видовых особенностей, пола и физиологического состояния животных.

В литературе отмечается [23], что в связывании кортизола в сыворотке крови человека и 25 видов позвоночных, в т. ч. крупного рогатого скота, принимает участие специфический кортикостероидсвязывающий

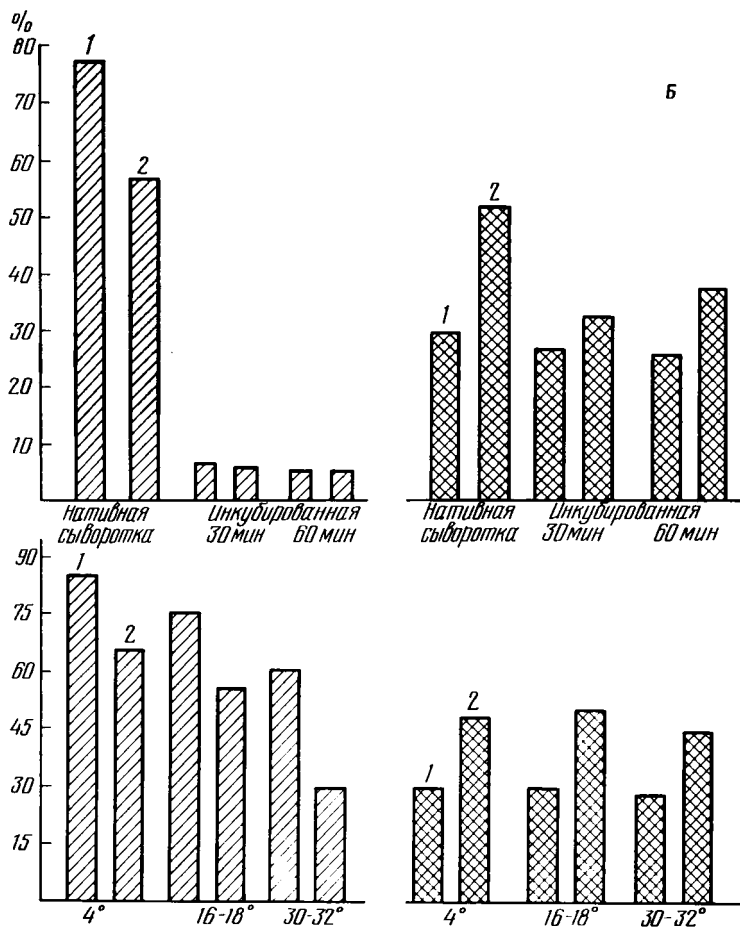


Рис. 4. Влияние температуры инактивации (вверху) и фракционирования (внизу) на связывание кортизола (А) и 17β-эстрадиола (Б). 1 и 2 — сыворотка крови соответственно новорожденных и 3-месячных телят.

глобулин (КСГ), близкий по своим свойствам у животных, находящихся на различных ступенях филогенетического развития. Однако КСГ не является единственным белком, способным связывать кортизол. Такой способностью обладают и некоторые другие белки сыворотки и прежде всего альбумин, связывающий практически все низкомолекулярные агенты [8]. Связывание альбумина со стероидами хотя и характеризуется низкой константой ассоциации (так как в этом процессе доминируют слабые гидрофобные взаимодействия), но не исключено, что альбумин-стероидный комплекс в процессе гель-фильтрации диссоциирует не полностью. Г. Р. Линднер [16], в частности, сообщает, что после фильтрации через гель в комплексе с кортизолом остается и альбумин.

Для определения доли кортизола, связанного с КСГ, гель-фильтрации подвергали образцы сыворотки, проинкубированные с меченым кортизолом и прогретые затем в течение 30—60 мин при 60°, т. е. при температуре, инактивирующей КСГ [5]. Процент связывания кортизола после 30-минутного прогревания снижался с 57—78 до 4—5 (рис. 4, А), при дальнейшей обработке этот показатель практически не менялся.

С целью уточнения роли сывороточного альбумина в связывании кортизола определяли процент связывания меченого гормона, проинкубированного с 4% БСА, приготовленным на забуференном физиологическом растворе (рН 7,4). При фракционировании образцов на колонках установлено, что 4% раствор БСА связывал 2,2—3,7% кортизола.

Аналогично транскортину в организме человека ведет себя КСГ

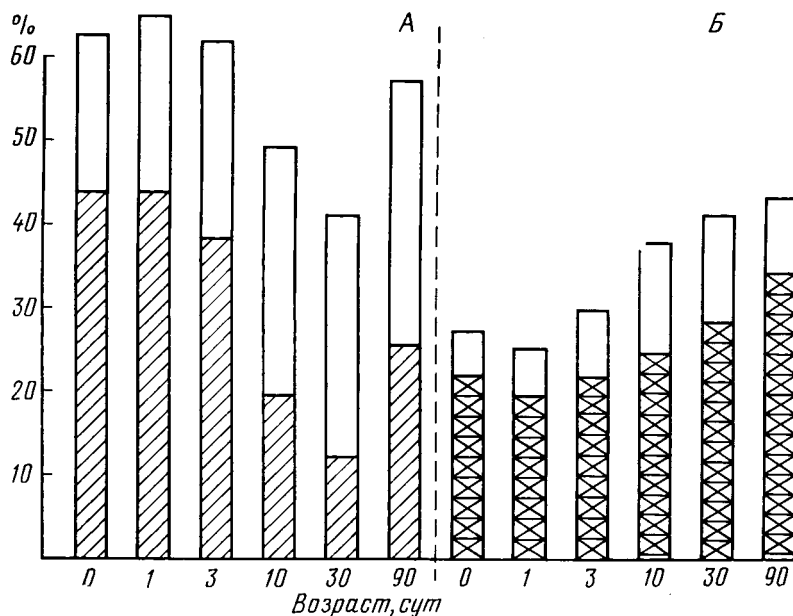


Рис. 5. Влияние добавки немеченных стероидов (100 нг/мл) на связывание кортизола (А) и 17β-эстрадиола (Б).

Общая высота столбика — процент связывания гормонов в нативной сыворотке, заштрихованная часть — после внесения добавки.

сыворотки крови крупного рогатого скота при различной температуре гель-фильтрации. Связывающая способность КСГ при изменении температуры фракционирования от 4 до 36° заметно снижается (рис. 4, А).

Для более детальной характеристики связывающей способности транспортных белков сыворотки крови телок определяли процент связывания кортизола при инкубировании образцов сыворотки с немеченым гормоном. Количество добавленного стероида (100 нг/мл) было подобрано эмпирически и примерно соответствовало концентрации кортизола в крови телок в момент рождения (78,3—95,4 нг/мл). Добавка немеченого гормона вызвала значительное снижение процента связывания кортизола (рис. 5, А). Так, у телят при рождении этот показатель снижался с 59—64 до 41—46 %, у 3-дневных телок — с 56—68 до 34—42%. Наиболее значительное снижение процента связывания кортизола (с 39—42 до 11—13) отмечено у месячных телят. Существенных различий между животными опытных и контрольной групп по градиенту снижения процента связывания не обнаружено.

Резкое уменьшение процента связывания кортизола при экзогенной добавке гормона, концентрация которого близка к физиологическому уровню (быстрая насыщаемость связывающих участков белка), свидетельствует о преобладающей роли в механизме белково-стероидного взаимодействия специфического связывания. Это дало возможность построить график взаимодействия кортизола с КСГ в координатах Скэтчарда, по которому вычисляли равновесную константу ассоциации ( $K_a$ ) и концентрацию мест связывания комплексообразующего белка ( $N$ ). Значение  $K_a$ , которое рассчитывали по данным, полученным при использовании метода гель-фильтрации, составляло  $1,49 \pm 0,13 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  и с возрастом телок существенно не изменялось. Аналогичные данные получены при использовании метода твердофазной адсорбции на угле, наиболее часто применяемого для изучения белково-стероидного взаимодействия [2]. Как видно из таблицы, результаты определения концентрации связывающих участков белка ( $N$ ) в сыворотке крови телят разного возраста, полученные обоими методами, хорошо согласуются. Значения  $N$  были наибольшими у телок сразу после рождения (106,8—108,0 нг/мл), затем они постепенно снижались, у месячных телок составляли



Концентрация связывающих участков КСГ сыворотки крови телок (нг/мл)

Возраст животных (n=3)*	Метод определения		Возраст животных (n=3)*	Метод определения	
	гель-фильтрация	адсорбция на угле		гель-фильтрация	адсорбция на угле
При рождении	106,8±19,8	108,0±5,0	10 сут	27,3±1,3	31,7±4,1
1 сут	99,2±22,1	100,0±7,1	1 мес	14,9±1,8	15,7±1,3
3 сут	89,4±14,6	80,0±13,7	3 мес	43,3±5,9	39,3±6,57

\* n — количество пулов сыворотки, использованных для определения N и  $K_a$ . Пул состоял из аликвот сыворотки крови 5 животных каждой группы.

всего 14,9—15,7 нг/мл, а к 3 мес вновь несколько увеличивались (39,3—49,3 нг/мл).

Можно предположить, что КСГ в крови телок имеет материнское происхождение. Это подтверждается данными о скорости его исчезновения из кровеносного русла. Период полураспада КСГ ( $T_{1/2\text{биол}}$ ), рассчитанный на основании полученных результатов (рис. 6), составляет 7 дней, что близко к  $T_{1/2\text{биол}}$  у человека — 6 дней [по 4].

Равновесная константа ассоциации  $K_a$ , определенная при использовании метода твердофазной адсорбции на угле, в среднем равняется  $1,51 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , т. е. на порядок ниже, чем  $K_a$ , определенная с помощью метода гель-фильтрации. Причина различий заключается, по всей вероятности, в разных температурных условиях определения, в присутствии в сыворотке эндогенных стероидов (при гель-фильтрации), а также в большем числе эмпирических точек, по которым проводился расчет (при использовании твердофазной адсорбции на угле).

Уровень кортизола в крови телят в течение 1-го месяца снижается более резко (рис. 6), чем концентрация связывающих участков КСГ (N). При этом последний показатель во все возрастные периоды превышает концентрацию гормона в крови. Биологический смысл отсутствия параллелизма в рассматриваемых процессах состоит, по-видимому, с одной стороны, в сохранении «резерва» связывающего белка для инактивации высоких уровней гормона, поступающего в кровеносное русло при различных экстремальных состояниях (стресс, болезни), а с другой — в предупреждении уменьшения концентрации кортизола в крови ниже определенного базального уровня.

Подобно другим рецепторным белкам КСГ в крови крупного рогатого скота способен связывать

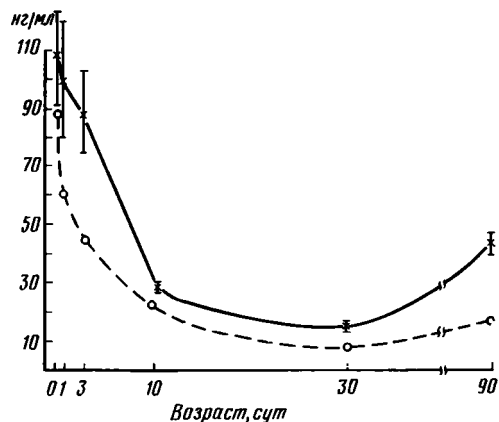


Рис. 6. Концентрация связывающих участков КСГ (нг/мл) в сыворотке крови телят.

Прерывистой линией показано изменение концентрации кортизола в сыворотке крови.

не только кортизол, но и другие стероиды аналогичного строения. Исследование конкурентного связывания кортизола при избытке немеченого кортикостерона (B), тестостерона (T) и прогестерона (P) показало, что по степени сродства к КСГ у крупного рогатого скота они располагаются следующим образом:  $F > B > T > P$ . Аналогичная последовательность сообщается для КСГ в крови человека и лабораторных животных [7].

Менее изучен вопрос о белковом связывании  $17\beta$ -эстрадиола. Известно, что в сыворотке крови млекопитающих присутствует ряд транспортных белков, способных

комплексироваться с  $17\beta$ -эстрадиолом. Этой способностью обладают, в частности, альбумин [8],  $\alpha$ -глобулин, специфически связывающий половые стероиды (ССГ — секстерондсвязывающий глобулин [6]), фетопротейн, играющий значительную роль в связывании эстрогенов у некоторых видов животных [18], и др.

Для определения доли специфического связывания  $17\beta$ -эстрадиола пробы, уравновешенные с меченым гормоном, прогревали в течение 30—60 мин при  $60^\circ$ . Эта процедура должна инактивировать ССГ, не влияя на эстрогенсвязывающую способность альбумина. Процент связывания  $17\beta$ -эстрадиола в сыворотке крови новорожденных телок при прогревании проб снижался незначительно (с  $27,1-29$  до  $23,7-25,7$ ), а у 3-месячных — весьма существенно (с  $49,1-52,6$  до  $32,0-37,4$ ). Это свидетельствует о повышении доли специфического связывания  $17\beta$ -эстрадиола в сыворотке крови телок с возрастом. Однако в общем связывании гормона доля участия ССГ относительно невелика (не более  $1/6-1/3$  части).

Незначительная роль специфических связывающих белков сыворотки крови телок в комплексировании  $17\beta$ -эстрадиола подтверждается также данными о снижении процента связывания при добавке в инкубационную смесь, уравновешенную с меченым лигандом, немеченого гормона. Существенного снижения процента связывания  $17\beta$ -эстрадиола удалось достичь лишь при добавке 100 нг гормона на 1 мл, что в 300 раз превышает максимальную его концентрацию у телок при рождении ( $0,28-0,32$  нг/мл). В случае же кортизола резкое снижение процента связывания обусловлено добавкой гормона в количестве, почти равном его максимальной концентрации в крови. С возрастом снижение процента связывания эстрадиола в сыворотке крови телок под влиянием добавки становится более выраженным: при рождении — с  $27,1 \pm 2,4$  до  $21,1 \pm 1,1$ , в месячном возрасте — с  $41,2 \pm 2,3$  до  $28,1 \pm 2,5$  (рис. 5, Б).

Сывороточный альбумин также играет в связывании эстрадиола, вероятно, не основную роль, хотя способность последнего связываться с альбумином значительно выше, чем кортизола. При гель-фильтрации уравновешенного с  $17\beta$ -эстрадиолом —  $6,7-^3\text{H}$  4 % раствора БСА установлено, что с альбумином связано не более 9—15 % гормона. Это позволяет предположить существование в сыворотке крови крупного рогатого скота по крайней мере еще одного белка (кроме ССГ и альбумина), принимающего участие в связывании  $17\beta$ -эстрадиола. Этот белок (или белки), по-видимому, является термостабильным, а по сродству к  $17\beta$ -эстрадиолу он занимает промежуточное положение между альбумином и ССГ.

### Заключение

Таким образом, имеется четко выраженная динамика концентрации кортизола и  $17\beta$ -эстрадиола в сыворотке крови телят, причем значительная часть этих гормонов находится в кровеносном русле в связанном с белком состоянии. Связывание кортизола характеризуется высоким сродством гормона и КСГ ( $K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$ ), избирательностью (сродство кортизола и КСГ выше, чем у других стероидов с аналогичным строением молекулы) и ограниченной емкостью (насыщающие концентрации гормона находятся в границах физиологической нормы), а связывание  $17\beta$ -эстрадиола с белком — низкой специфичностью и насыщенностью.

Это свидетельствует о различной емкости белкового буфера крови по отношению к указанным стероидам, что следует учитывать при рассмотрении вопроса об эффективности гормональных обработок крупного рогатого скота, так как вводимые дозы препаратов не всегда оказывают ожидаемое воздействие. Г. Х. Стотт [24], в частности, приводит ряд фактов, когда введением АКТГ удавалось имитировать стресс у новорожденных телят и снизить у них количество всасываемых из молозива иммуноглобулинов, в то время как введением кортизола достигнуть

такого эффекта не удавалось. При создании с экспериментальной целью стрессовых условий для телят уровень кортикостероидов в их крови повышался, однако это не вызывало явлений, сопровождающих стресс [18]. Не вдаваясь в обсуждение корреляции между связывающей способностью белков сыворотки крови и описанными выше явлениями, подчеркнем лишь необходимость учета параметров белково-стероидного взаимодействия при определении эффективных доз гормональных препаратов, используемых с различными целями на сельскохозяйственных животных. Особенно важно эти параметры учитывать в ранний постнатальный период, когда они резко изменяются во времени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вахитова В. Т. Применение кортизола и преднизолона в профилактике диареи новорожденных телят. — Сб. науч. тр.: Профилактика болезней с.-х. животных Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1982, с. 56. — 2. Волчек А. Г., Смирнов А. Н. Конкурентный белковосвязывающий анализ гормонов. — Проблемы эндокринологии, 1974, т. XX, № 6, с. 86—97. — 3. Мицкевич М. С. Гормональная регуляция в онтогенезе животных. — М.: Наука, 1978. — 4. Розен В. Б. Взаимодействие кортизола с транскортином при эндокринных заболеваниях. — В сб.: Современные вопросы эндокринологии. М.: Медицина, 1968, с. 141—150. — 5. Розен В. Б. Методы определения связывания стероидных гормонов белками плазмы. — В сб.: Совр. методы определения стероидных гормонов в биолог. жидкостях. М.: Медицина, 1968, с. 66. — 6. Розен В. Ю., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. — М.: Наука, 1981. — 7. Сергеев В. П. Стероидные гормоны. — М.: Наука, 1984, с. 75. — 8. Чегер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. — Бухарест, 1975. — 9. Шамберев Ю. Н., Эпштейн Н. А., Волчек А. Г. Изучение взаимодействия стероидных гормонов с белками плазмы у крупного рогатого скота. — Изв. ТСХА, 1969, вып. 5, с. 150—157. — 10. Эпштейн Н. А., Гончарова И. Б., Баранова О. К. Содержание стероидных гормонов в плазме крови и их связь с показателями естественной резистентности у телят. — Изв. ТСХА, 1982, вып. 5, с. 145—151. — 11. Bosc M., Fevre S. C. R. — Acad. Sc. Paris, t. 284, Serie D, 1984, N 23, p. 2373—2376. — 12. De Moor P. et al. — Acta Endocrinol., 1960, vol. 33, p. 297. — 13. De Moor P. et al. — J. Clin. Invest., 1962, vol. 41, p. 816. — 14. Harrison F. A., Paterson J. V. F. — J. Endocrinol., 1965, vol. 33, p. 477. — 15. Kelley K. W. — Ann. Tech. Vet., 1980, vol. 11, N 4, p. 444—478. — 16. Lindner H. R. — J. Endocrinol., 1964, vol. 28, N 3, p. 301. — 17. Mc Donald L. F. — Veterin. Endocrin a. Reproduction Philadel., 1969. — 18. Miriewski G. I. — Fed. Proc., 1982, vol. 41, N 5, p. 1493. — 19. Nightengale G. T. — Thesis. University of Arizona, Tucson, 1979. — 20. Sandberg A. et al. — In: Rec. Progr. Hormon. Res. N. Y., 1957, vol. 13, p. 209. — 21. Scatchard G. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1946, vol. 51, p. 660—662. — 22. Seal C. S., Dow R. P. — J. Biol. Chem., 1962, vol. 237, p. 3136. — 23. Seal C. S., Dow R. P. — Endocrinology, 1963, vol. 73, p. 271—275. — 24. Stott G. H. — J. Dairy Sci., 1980, vol. 63, p. 681—688.

*Статья поступила 17 мая 1985 г.*

## SUMMARY

Dynamics of cortisol and 17  $\beta$ -estradiol content in periferic blood under normal and experim. conditions (introducing ethynil-estradiol and prednizolon orally with colostrum) has been studied in Black-and-White heifers from birth till 3-month age by radio-immunological method.

Percentage of fixation of the mentioned steroids by serum protein and certain parametres of protein-steroid interaction (the association constant and molar concentration of fixing parts of complex-forming protein) has been determined by methods of gel-filtration and solid-phase adsorption on activated carbon.

The article contains data on the influence of oral introducing steroids and hormone fixation in heifers, and emphasized the necessity to record data on age dynamics of cortisol and 17  $\beta$ -estradiol in blood, as well as parametres of their interaction with serum proteins when determining effective doses of hormonal preparations applied for various purposes.