

Н. А. Панова

Влияние рецепторного аппарата молочной железы на содержание эстрогенов в ходе лактационного процесса у крыс

Аннотация.

Цель: Изучить механизмы снижения концентрации эстрогенов в молочной железе.

Материалы и методы. В опыте использовали препараты молочной железы, полученные от лактирующих крыс. Рецепторы к эстрадиолу выявляли, используя авторадиографическое исследование и биохимический метод в цитозольной фракции. Специфичность связывания эстрадиола определяли как разность между общим связыванием при инкубации в среде, содержащей 10^{-9} М ^3H -17 β эстрадиола, и связыванием при инкубации в среде, содержащей кроме меченного гормона 100 кратный избыток немеченого эстрадиола. В процессе промывки выявляли структуры, обладающие значительным сродством к гормону.

Результаты. В результате исследования установлена рецепция эстрадиола клетками альвеолярного отдела молочной железы в период лактации. В альвеолах молочной железы происходит интенсивное связывание меченного эстрадиола железистыми клетками и лейкоцитами. При высоких значениях специфического связывания эстрадиола интенсивно меченные клетки располагаются в виде тесного скопления. Показателем мембранного связывания эстрадиола являются многочисленные гранулы серебра, скапливающиеся над клеточной границей.

Заключение. Проводимое исследование позволило проанализировать рецепцию эстрадиола в гормонозависимой ткани (молочной железы). Клетки лейкоцитарного ряда имеют рецепторы к эстрогенам, позволяющим снизить уровень гормона в результате лактации. В молочной железе существует механизм снижения концентрации эстрогенов. Способность рецепторного связывания лейкоцитов позволяет говорить об участии клеток молока и молозива в снижении уровня эстрогенов, что является одним из важных факторов уменьшения развития патологических процессов в тканях молочной железы.

Ключевые слова: молочная железа, лактация, рецепторы, эстрадиол, альвеола, крысы, лейкоциты.

Автор:

Панова Наталия Александровна – кандидат биологических наук, доцент; Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5; e-mail: panova_na@mail.ru.

Введение. Пролиферация (митоз) клеток эпителия молочной железы наблюдается после уменьшения концентрации прогестерона. 98% эпителиальных клеток молочной железы в период роста (пролиферации) имеют эстрогенные и прогестероновые рецепторы. Одни из клеток являются прогестерон-чувствительными, другие прогестерон-нечувствительными, но до сих пор неизвестно, как распределены эти клетки и как регулируется в них паттерн (порядок) размещения прогестероновых рецепторов [1].

Установлено, что введение эстрогенов или прогестерона способствует усилению кровоснабжения молочной железы [2]. После введения эстрогенов или кортикостероидов кровоснабжение железы усиливается, число капиллярных сплетений вокруг выводных протоков несколько возрастает. Совместное введение эстрогенов, прогестерона или соматотропина повышает интенсивность кровоснабжения в молочной железе до уровня, наблюдающегося обычно во второй

половине беременности. При этом реакция сосудов молочной железы на введение одного эстрогена или же совместно эстрогена и прогестерона у интактных и кастрированных мышей примерно одинаковая [3].

Функциональная гетерогенность эпителиальных клеток эндометрия, обнаруженная при исследовании пролиферативной активности, предполагает существование различий между клетками желез и эпителиальным покровом полости матки. Клетки, выстилающие полость матки, обладают высокой чувствительностью к эстрогенам и бурно реагируют на изменение гормонального баланса в организме.

Доказано, что жировая ткань молочной железы содержит высокую концентрацию рецепторов к эстрогенам и гораздо меньшую — рецепторов к прогестерону [4]. Начальные стадии ответа репродуктивных органов на гормональные воздействия тесно связаны со специфической резорбцией эстрадиола. Большинство патологических измене-

ний полых органов тесно связаны с нарушением восприятия гормональных сигналов [3, 5].

Лишь небольшая часть эстрогенов находится в свободном состоянии. Биологической активностью обладает только свободная форма гормона. Связанные гормоны являются «оперативным» запасом организма и в случае возрастания потребности в них мобилизуются из связанного состояния, переходя в свободную форму. Свободная фракция эстрогенов, благодаря своей липофильности, может легко проникать в ядро клетки. Именно в ядре локализованы рецепторы к эстрогенам и прогестерону [6]. После воздействия на клетку молекула эстрогена разрушается и выводится из организма. Стероидные гормоны — это липофильные соединения, молекулы которых выводятся из организма только после перевода их в водорастворимую форму. Для этого в организме имеется арсенал ферментов. Они же используются для детоксикации ксенобиотиков [7].

При анализе отечественной и зарубежной литературы становится очевидной связь между высокой концентрацией эстрогенов в крови и наличием опухолей молочной железы. Данный факт обосновывается большим количеством рецепторов к эстрадиолу в молочной железе, но механизм выведения гормона из организма до конца не выявлен.

Цель исследований — изучение механизмов снижения концентрации эстрогенов в молочной железе.

Материалы и методы. В опыте использовано 25 животных, подобранных по методу пар-аналогов. Готовили препараты молочной железы, полученные от лактирующих крыс. Выявляли рецепторы к эстрадиолу по методу Штумпфа, используя автордиографическое исследование связывания эстрогензависимыми тканями крысы [8]. Одновременно с автордиографическим исследованием рецепцию эстрадиола определяли биохимическим методом в цитозольной фракции. С целью уменьшения расхода меченных эстрогенов отказались от введения меченного гормона подопытным животным, а инкубировали эксплантаты матки в капле среды I99, содержащей 10^{-9} М³H эстрадиола.

Инкубацию проводили во влажной камере на миллипоровых фильтрах 1 час при 37°C. Обработка криостатных срезов и последующее приготовление радиоавтографов с соблюдением всех требований «сухого» варианта метода проводили параллельно с исследованиями материала, зафиксированного в 10% нейтральном формалине. Сравнивали автографы, полученные «сухим» и обычным способом, причем выявлено их принци-

пиальное сходство, которое позволило в дальнейшей работе исследовать связывание гормона на фиксированном материале. Специфичность связывания эстрадиола определяли как разность между общим связыванием при инкубации эксплантатов матки в капле среды, содержащей 10^{-9} М³H-17 β эстрадиола, и связыванием при инкубации в среде, содержащей кроме меченного гормона 100 кратный избыток немеченого эстрадиола.

Согласно метода Uriel R. [9], основанного на высоких константах ассоциации стероидов с клеточными рецепторами, взаимодействие эстрогена и рецептора происходит непосредственно на фиксированном гистологическом препарате. Удаляя в процессе промывки несвязанный гормон, выявляли структуры, обладающие значительным сродством к гормону, причем предварительная подготовка препарата (фиксация в абсолютном эталоне, заливка в парафин, депарафинирование срезов) обеспечивает удаление эндогенных стероидов, маскирующих часть рецепторов. Для морфологического анализа использованы параллельные срезы из блоков, подготовленных для автордиографии.

Результаты. При сопоставлении результатов биохимического исследования рецепции эстрадиола и данных автордиографического анализа можно отметить общую тенденцию — увеличение связывания гормона со специфическими рецепторами в тканях молочной железы. Обращает на себя внимание то, что при высоких значениях специфического связывания эстрадиола интенсивно меченные клетки располагаются в виде тесного скопления, а при известной "нормализации" структуры органа можно отметить и снижение рецепции эстрогенов. Установлена рецепция эстрадиола клетками альвеолярного отдела молочной железы в период лактации.

По данным автордиографического исследования, в альвеолах молочной железы происходит интенсивное связывание меченного эстрадиола железистыми клетками и клетками лимфоидного ряда, локализованными в полости альвеолы (рис. 2, 3). Интенсивность связывания метки при стандартных сроках экспозиции настолько высока, что высокая концентрация восстановленных зерен серебра не позволяет рассмотреть структуру клеток молочной железы. Снижение сроков экспозиции позволяют рассмотреть детали распределения метки в клетках железистого эпителия. Зерна восстановленного серебра обнаруживаются над ядрами и цитоплазмой секреторных клеток. Обнаружены также многочисленные гранулы серебра, выстраивающиеся над

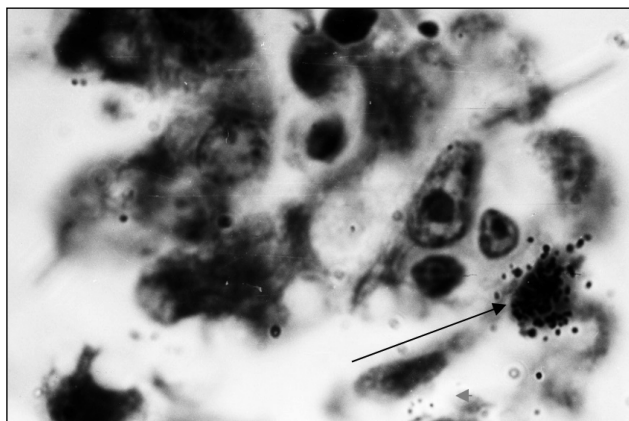


Рис. 1. Молочная железа крысы. Метка показывает локализацию рецепторов к эстрадиолу. Клетка находится в соединительной ткани. Связывание эстрадиола. Ув. x 900

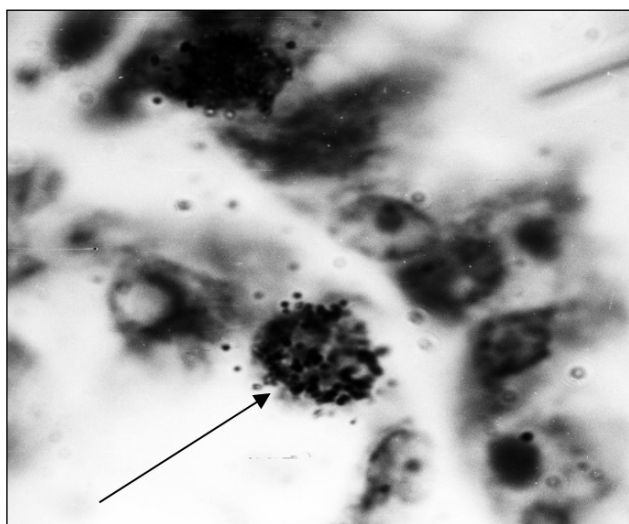


Рис. 2. Молочная железа крысы. Меченная клетка располагается в полости альвеолы. Связывание эстрадиола. Ув. x 900.

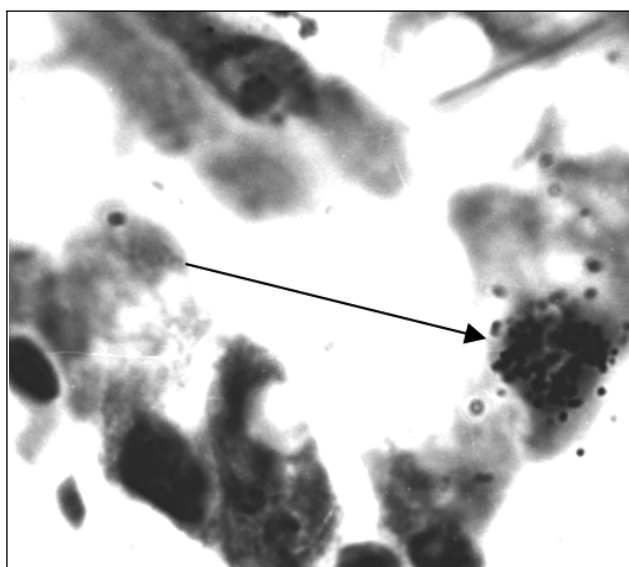


Рис. 3. Молочная железа крысы. Меченная клетка располагается в секреторном эпителии. Связывание эстрадиола. Ув. x 900.

клеточной границей, что можно интерпретировать как показатель мембранного связывания эстрадиола (рис. 2, 3).

Обсуждение. Оценивая данные авторадииографического исследования, необходимо отметить, что по локализации зерен восстановленного серебра на фотоэмульсии можно говорить о том, что рецепторами к эстрогенам в лактационный период обладают только отдельные клетки, способные к свободному перемещению в пределах ткани молочной железы. Вполне очевидно, что такими клетками являются лейкоциты, способные мигрировать в соединительные ткани межальвеолярного пространства, внедряться в пласт секреторного эпителия (рис. 2), выходить в пространство полости альвеолы (рис. 3) [10, 11, 12].

Известно, что при повышении содержания эстрогенов, гранулоциты ингибируют ткани репродуктивных органов и молочной железы, а в последующем удаляются из организма [13]. Интенсивно связывая эстрогены, лейкоциты принимают участие в снижении уровня стероидных гормонов и удалении их из организма. При подавлении продукции эстрадиола и нарушении гормонального влияния на молочную железу не развивается и реакция лимфоидных клеток. Таким образом, единственными клетками, способными связывать эстрогены и удалять их из полости молочной железы, являются клетки лейкоцитарного ряда. Косвенно о существовании подобного механизма говорят данные, раскрывающие изменения содержания лейкоцитов в молоке при восстановлении полового цикла. После восстановления цикла в молоке появляется значительное количество лейкоцитов. В данной работе предполагается альтернативный путь удаления эстрогенов клетками лейкоцитарного ряда из ткани молочной железы. Пути связывания эстрогенов были рассмотрены в ряде работ [14], что дало основание предполагать возможность удаления эстрогенов с клетками, имеющими специфические рецепторы. Эстрогены регулируют широкий спектр различных функций, они связываются с рецепторами клетки и активируют экспрессию различных генов. Наиболее важными функциями эстрогенов считают активацию пролиферации, а также ингибирование апоптоза, стимуляцию выработки факторов роста [15].

Проводимое исследование позволило проанализировать рецепцию эстрадиола в гормонозависимой ткани (молочной железы). При этом было отмечено, что лимфоидные клетки, расположенные в полости альвеол, связывают меченый гормон активно.

Заключение. В молочной железе существует механизм снижения концентрации эстрогенов. В момент лактации наблюдается увеличение специфического связывания эстрадиола, а в период функционального покоя органа можно отметить снижение рецепции эстрогенов.

Клетки лейкоцитарного ряда имеют рецепторы к эстрогенам, позволяющим снизить уровень гормона в результате лактации. В мигрирующих через альвеолярный эпителий лейкоцитах обнаружена способность рецепторного связывания, что позволяет говорить об участии клеток молока и молозива в снижении уровня эстрогенов. Это является одним из важных факторов уменьше-

ния развития патологических процессов в тканях молочной железы.

В ходе предлактационной подготовки и при зрелом лактационном процессе роль иммунного механизма является исключительно важной. Об этом можно судить, оценивая факторы неспецифической резистентности в период лактогенеза в регуляции установившегося секреторного процесса. Практически на всех этапах лактации, начиная с предлактационной подготовки до постлактационной инволюции, система иммунитета активно включается в ход регуляции секреторного процесса и во многом определяет конечный результат в деятельности органа.

Литература

1. Бабичев В. Н. Радиоиммунологическое определение лютеинизирующего гормона в гипофизе и крови крыс в эстральном цикле / В. Н. Бабичев, Е. И. Адамская, В. М. Самсонова // Пробл. эндокринол. — 1975. — № 21. — С. 63-66.
2. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2001. — С. 54-62.
3. Варга С. В. Эстрадиолсвязывающая и эстрадиолзадерживающая способность органов-мишеней самок крыс с нарушением половой дифференцировки мозга / С. В. Варга, А. Г. Резников // Физиол. журн. АН УССР. — 1978. — № 24. — С. 3-6.
4. Дедов И. И. Зависимость андрогенизации от дифференцировки гипоталамических центров / И. И. Дедов, Н. А. Дёмина // Бюлл. Эксперим. Биол. и мед. — 1978. — № 85. — С. 207-209.
5. Носенко Н. Д. Влияние неонатальной андрогенизации на биогенные моноамины гипоталамуса и функциональную активность гипофиза крыс / Н. Д. Носенко, О. Н. Зряков, А. Г. Резников // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1976. — № 8. — С. 112-114.
6. Розен В. Б. Основы эндокринологии / В. Б. Розен. — М.: Высшая школа, 1980. — С. 48-52.
7. Варфоломеев С. Д. Химическая энзимология / С. Д. Варфоломеев. — М.: Издательский центр "Академия", 2005. — С. 238-239.
8. Tchernichin A. N. Oestrogen levels in the blood not in the uterine eosinophilia / A. N. Tchernichin, P. Galand // J. Endocr. — 1983. — Vol. 99. — P. 37-41.
9. Uriel R. A radioautographic method for the localization of steroid ligands and receptors by cell affinity labeling / R. Uriel // Exp. Cell Res. — 1979. — Vol. 80. — № 2. — P. 449-453.
10. Панова Н. А. Состав иммунокомпетентных клеток и клеточная структура молочной железы у мышей в фазы лактации и физиологического покоя / Н. А. Панова, В. Г. Скопичев, П. А. Полистовская // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2017. — № 3. — С. 193-196.
11. Панова Н. А. Изучение лейкоцитарного профиля в молочной железе лактирующих крыс под влиянием окситоцина / Н. А. Панова, Л. Ю. Карпенко // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2022. — № 3. — С. 56-58
12. Panova N. A. A role for cellular immunity in early postpartum period / N. A. Panova, V. G. Skopichev // Medical Immunology (Russia). — 2021. — Vol. 23. — № 4. — P. 853-858.
13. Stumpf W. E. Autoradiographic techniques for the localization of hormones and drugs at the cellular and subcellular levels / W.E. Stumpf // Acta endocrinol. — 1971. — Vol. 67. — P. 205-222.
14. Скопичев В. Г. Молоко: учеб. пособие / В. Г. Скопичев, Н. Н. Максимюк. — Санкт-Петербург: Проспект Науки, 2011. — 368 с.
15. Скопичев, В. Г. Иммунобиология молочной железы и молочная продуктивность / В. Г. Скопичев, В. Б. Прозоровский. — Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. — 328 с.

Panova N.

Influence of the receptor apparatus of the mammary gland on the content of estrogens during the lactation process in rats

Abstract.

Purpose: To study the mechanisms of reducing the concentration of estrogens in the mammary gland.

Materials and methods. In the experiment, breast preparations obtained from lactating rats were used. Estradiol receptors were detected using autoradiographic study and biochemical method in the cytosolic fraction. The specificity of estradiol binding was determined as the difference between the total binding during incubation in a medium containing 10^{-9} M ^3H -17 β estradiol and binding during incubation in a medium containing, in addition to the labeled hormone, a 100-fold excess of unlabeled estradiol. During the washing process, structures with significant affinity for the hormone were revealed.

Results. As a result of the study, the reception of estradiol by the cells of the alveolar part of the mammary gland during lactation was established. In the alveoli of the mammary gland, there is an intense binding of labeled estradiol by glandular cells and leukocytes. At high values of specific binding of estradiol, intensely labeled cells are located in the form of a close cluster. An indicator of the membrane binding of estradiol is the numerous silver granules accumulating over the cell border.

Conclusion. The study made it possible to analyze the reception of estradiol in hormone-dependent tissue (mammary gland). Leukocyte cells have estrogen receptors, which reduce the level of the hormone as a result of lactation. In the mammary gland, there is a mechanism for reducing the concentration of estrogens. The ability of leukocyte receptor binding allows us to speak about the role of milk and colostrum cells in reducing the level of estrogens, which is one of the important factors in reducing the development of pathological processes in breast tissues.

Keywords: mammary gland, lactation, receptors, estradiol, alveoli, rats, leukocytes.

Author:

Panova N. – PhD (Biol. Sci.); Associate Professor, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, St. Petersburg, Chernigovskaya st., 5, 3; e-mail: panova_na@mail.ru.

References

1. Babichev V. N. Radioimmunological determination of luteinizing hormone in the pituitary gland and blood of rats in the estrous cycle / V. N. Babichev, E. I. Adamskaya, V. M. Samsonova // Probl. endocrinol. – 1975. – № 21. – P. 63-66.
2. Borisov L. B. Medical microbiology, virology, immunology. - M.: LLC "Medical Information Agency", 2001. – P. 54-62.
3. Varga S. V. Estradiol-binding and estradiol-retaining ability of target organs in female rats with impaired brain sexual differentiation / S. V. Varga, A. G. Reznikov // Fiziol. magazine AN Ukrainian SSR. – 1978. – № 24. – P. 3-6.
4. Dedov I. I. Dependence of androgenization on the differentiation of the hypothalamic centers / I. I. Dedov, N. A. Demina // Bull. Experiment. Biol. and honey. – 1978. – № 85. – P. 207-209.
5. Nosenko N. D. Effect of neonatal androgenization on the biogenic monoamines of the hypothalamus and the functional activity of the pituitary gland in rats / N. D. Nosenko, O. N. Zryakov, A. G. Reznikov // Bull. expert biol. and honey. – 1976. – № 8. – P. 112-114.
6. Rosen V. B. Fundamentals of endocrinology / V. B. Rosen. – M.: Higher School, 1980. – P. 48-52.
7. Varfolomeev S. D. Chemical enzymology / S. D. Varfolomeev. – M.: Publishing Center "Academy", 2005. – P. 238-239.
8. Tchernichin A. N. Oestrogen levels in the blood not in the uterine eosinophilia / A.N. Tchernichin, P. Galand // J. Endocr. – 1983. – Vol. 99. – P. 37-41.
9. Uriel R. A radioautographic method for the localization of steroid ligands and receptors by cell affinity labeling / R. Uriel // Exp. Cell Res. – 1979. – Vol. 80. – № 2. – P. 449-453.

10. Panova N. A. The composition of immunocompetent cells and the cellular structure of the mammary gland in mice in the phases of lactation and physiological rest / N.A. Panova, V. G. Skopichev, P. A. Polistovskaya // Issues of legal regulation in veterinary medicine. – 2017. – № 3. – P. 193 -196.
11. Panova N. A. Study of the leukocyte profile in the mammary gland of lactating rats under the influence of oxytocin / N. A. Panova, L. Yu. Karpenko // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2022. – № 3. – P. 56-58
12. Panova N. A. A role for cellular immunity in early postpartum period / N. A. Panova, V. G. Skopichev // Medical Immunology (Russia). – 2021. – Vol. 23. – № 4. – P. 853-858.
13. Stumpf W.E. Autoradiographic techniques for the localization of hormones and drugs at the cellular and subcellular levels / W.E. Stumpf // Acta endocrinol. – 1971. – Vol. 67. – P. 205-222.
14. Skopichev V. G. Milk: textbook. allowance / V. G. Skopichev, N. N. Maksimyuk. - St. Petersburg: Prospekt Nauki, 2011. – 368 p.
15. Skopichev V. G. Immunobiology of the mammary gland and milk productivity / V. G. Skopichev, V. B. Prozorovsky. - Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. – 328 p.