

## СВЯЗЫВАНИЕ АЛЬДОСТЕРОНА РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОК ПОЧЕК ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Для выяснения механизмов изменения гормональной регуляции метаболизма и функции органов при старении существенное значение имеет оценка реакции тканей на действие гормонов. Большим комплексом работ, проведенных в Институте геронтологии АМН СССР, было показано, что при старении изменяется реактивность органов на гормональные влияния, повышается их чувствительность и суживается диапазон приспособления при воздействии нарастающих доз гормональных препаратов [3, 6]. Эти данные позволяют предположить, что при старении происходят сдвиги в механизмах взаимодействия клеток с регуляторными гормональными влияниями. Как известно, в основе этого механизма лежат гормонально-рецепторные взаимодействия. К настоящему времени в литературе накоплен большой, хотя и разноречивый фактический материал об изменениях гормональных рецепторов с возрастом. В обзора Рока [10, 11] приводятся сведения о том, что при старении ряд гормональных рецепторов не изменяется, количество некоторых из них в разных органах растет, а других — падает. Это касается рецепторов глюкокортикоидов, тиреоидных и половых гормонов, адренорецепторов. Вместе с тем в литературе до сих пор не опубликовано данных об изменении с возрастом альдостероновых рецепторов.

В настоящей работе приведены данные об изменениях состояния альдостероновых рецепторов клеток почек (основной ткани-мишени альдостерона) у взрослых и старых животных.

**Методика.** Опыты проведены на взрослых (4—5 мес) и старых (28—30 мес) белых крысах. Альдостероновые рецепторы определяли по [4, 5]. После декапитации животных через брюшную аорту производили перфузию почек холодным буферным раствором, содержащим (в ммолах/л) сахарозы — 250, хлористого магния — 3, трисбуфер — 10, pH 8,0. Почки трех взрослых или двух старых животных объединяли и гомогенизировали в 10 мл указанного буфера. Гомогенат центрифугировали при 900 g 10 мин. Для получения цитозольной фракции надосадочную жидкость центрифугировали при 105000 g, 60 мин (ультрацентрифуга Beckman SL5-50, ротор SW-50). Осадок ядер ресусцинировали в 2,2 M сахарозе и центрифугировали при 22000 g 60 мин (ротор SW-27). Полученный осадок ядер промывали в 10 мл исходного трис-сахарозного буфера и осаждали при 700 g 10 мин. Осадок промытых ядер ресусцинировали в том же буфере.

Связывание альдостерона цитозольной фракцией определяли инкубируя 0,4 мл цитозола (содержание белка 2 кг) с различными концентрациями  $^3\text{H}$ -альдостерона (удельная активность  $152 \cdot 10^{10}$  Бк/ммоль, фирма «Амершам», Англия) — от 0,125 до 5,0 нмоль — 30 мин при 25 °C. Связанный с белком альдостерон высаливали сернокислым аммонием, добавляя его до 50 % насыщения с последующим выдерживанием в ледяной бане 30 мин, после чего центрифугировали при 10000 g. Надосадочную жидкость отсасывали водоструйным насосом, а осадок, содержащий связанный с белком гормон, растворяли в 0,4 мл трис-буфера, pH 7,4. В аликвотах определяли содержание белка и радиоактивность. Параллельно определяли неспецифическое связывание  $^3\text{H}$ -альдостерона. Для этого к пробам наряду с меченным гормоном добавляли в 2000 раз большее количество немеченого альдостерона, и дальнейшую обработку проводили как описано выше.

Для определения способности ядер связывать альдостерон 0,2 мл суспензии ядер инкубировали 60 мин при 25 °C с различными концентрациями  $^3\text{H}$ -альдостерона, который был преинкубирован с цитозолом 10 мин при 25 °C. После инкубации пробы помещали в ледянную баню, добавляли по 5 мл транс-сахарозного буфера и немедленно фильтровали через фильтры фирмы «Милипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтры с осадком связанного гормона помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью ЖС-106. Радиоактивность проб измеряли на счетчике Марк-Ш, США. Содержание белка определяли по методу Лоури в модификации Марквел [8]. Число связывающих мест и константу диссоциации определяли по методу Скэтчарда [12].

**Результаты и обсуждение.** При инкубации цитозольной фракции с различными концентрациями  $^3\text{H}$ -альдостерона оказалось, что цитозол старых крыс связывает меченный гормон больше, чем взрослых. Это может указывать на то, что у старых животных изменяется либо количество связывающих мест, либо диссоциация гормон-рецепторного комплекса. Анализ графиков Скэтчарда показывает, что число связывающих мест для альдостерона в цитозоле клеток почек взрослых крыс равно  $4,7 \times 10^{-14}$  моль/мг белка, а у старых почти в два раза меньше —  $2,9 \cdot 10^{-14}$  моль/мг (см.

рисунок). В то же время константа диссоциации гормона с рецептором у старых животных значительно ниже, чем у взрослых —  $0,43 \cdot 10^{-9}$  и  $0,83 \cdot 10^{-9}$  моль/л. Эти данные свидетельствуют о том, что повышение связывания  $^3\text{H}$ -альдостерона цитозолом клеток печени старых крыс обусловлено увеличением сродства рецепторов к гормону.

Образовавшийся в цитозоле альдостерон-рецепторный комплекс транспортируется в ядро к акцепторным участкам хроматина, взаимодействие с которыми приводит к реализации биологического эффекта гормона.

Исследование ядерного связывания  $^3\text{H}$ -альдостерона показало, что, в противоположность цитоплазматическому, оно у взрослых животных несколько выше, чем у старых. Построение Скэтчардовского графика позволило установить, что у взрослых животных количество связывающих мест для альдостерона в ядрах клеток почек почти в 2,5 раза больше, чем у старых —  $5,3 \cdot 10^{-14}$  и  $2,1 \cdot 10^{-14}$  моль/мг белка соответственно. Константа диссоциации у взрослых крыс ( $1,6 \cdot 10^{-9}$  моль/л в четыре раза выше, чем у старых ( $0,35 \cdot 10^{-9}$  моль).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в цитоплазме и ядрах клеток почек старых крыс снижается количество альдостероновых рецепторов. Следует от-

График Скэтчарда связывания  $^3\text{H}$ -альдостерона с цитозолем взрослых (1) и старых (2) крыс.  
По вертикали — альдостерон, связанный/свободный (моль  $\times 10^{-14} \cdot \text{мг}^{-1}$  белка/нмоль/л). По горизонтали — связанный альдостерон (моль  $\cdot 10^{-14} \cdot \text{нмоль}^{-1}/\text{мг}$  белка).

метить, что расчет количества связывающих мест по графикам Скэтчарда не позволяет определить абсолютное число рецепторов, на что обоснованно указывает Клотт [7]. По мнению этого автора, количество рецепторов должно быть значительно большим (по крайней мере в два раза). У старых животных снижается также и величина константы диссоциации, что указывает на повышение сродства рецепторов к альдостерону. Именно это явление может лежать в основе механизма повышения чувствительности тканей старых животных к альдостерону, что было показано нами в предыдущих работах [2]. Сопоставление полученных данных с возрастными изменениями количества натрия в организме [1,9] и функциональным состоянием клубочковой зоны коры надпочечников, осуществляющей регуляцию ионного гомеостаза, показывает, что увеличение уровня натрия в клетках различных тканей может быть обусловлено снижением количества рецепторов связывающих альдостерон.

Таким образом, при старении наступают существенные изменения в механизмах реализации биологического действия альдостерона на этапе гормон-рецепторных взаимоотношений.

### Список литературы

- Купраш Л. П. Особенности водно-электролитного обмена у лиц пожилого и старческого возраста. — Мед. сестра, 1975, № 3, с. 43—45.
- Майдич Л. В. Изменение гипоталамо-гипофизарной регуляции секреции альдостерона при старении. — В кн.: IV Всесоюз. съезд геронтологов и гериатров: Тез. и реф. докл. Киев, 1982, с. 229.
- Свечникова Н. В., Вержиковская Н. В., Беккер В. И., Мороз Е. В. Железы внутренней секреции в процессе старения. — Киев, 1983.—152 с.
- Селяцкая В. Г., Мертвецов Н. П., Шульга В. А. Распределение минералокортикоидных рецепторов в клетках почек крыс при различных уровнях содержания альдостерона в организме. — Пробл. эндокринологии, 1976, 22, № 6, с. 83—88.
- Селяцкая В. Г., Стребкова Т. М., Мертвецов Н. П. и др. Связывание  $^3\text{H}$ -альдостерона с цитоплазматическими рецепторами почки при различных функциональных состояниях органа-мишени. — Там же, 1975, 21, № 4, с. 78—82.
- Фролькис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы. — Киев, 1981.—320 с.
- Klotz I. M. Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies. — Science, 1982, 217, N 4536, p. 1247—1249.
- Markwell M. A. K., Haas S., Bieber L., Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. — Analyt. Biochem., 1978, 87, N 3, p. 206—210.
- Novak L. P. Aging, total body potassium, fat-free mass, and cell mass in males and females between 18 and 85 years. — J. Gerontology, 1972, 27, N 4, p. 438—443.

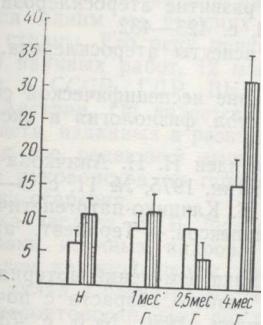
- Roth G. S. Hormone for aging research. —
- Roth G. S., Hess G. L. action during aging: tions. A review. — Mec Acad. Sci., 1949, 51, N

Ин-т геронтологии  
АМН СССР, Киев

УДК 616.12—008.331.1+616.13—

### ЦИРКУЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕН ГИПЕРТОН У ЖИ

В последние годы морального и клеточного склерозе. Некоторые иммунные комплексы [5, 7] при атеросклерозе придают при этом заболевании. Объ кровяном русле, могут физиологических веществ, повремя циркуляции ИК в



степень повреждения сосудов, особенностей комонуклеарных фагоцитов ответ на воздействие специфических антител. Так, иммунизация животных холестеринемии, ведет к повышенной гемодинамической нарушениях сходны с атеросклерозом. Однако вопрос о значимости является различно и требует дальнейшего изучения.

**Методика.** В опыт был введен в группу животных из 14 кроликов породы «Шиншила» вали двусторонней (с интервалом 1/3—1/4 первоначальной длины), из которых 14 кроликов были разделены на 4 группы, начиная с месячного срока.