

СВЯЗЫВАНИЕ АЛЬДОСТЕРОНА РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОК ПОЧЕК ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Для выяснения механизмов изменения гормональной регуляции метаболизма и функций 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 обзорах Роса [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 ммоль/л) сахарозы — 250, хлористого магния — 3, трис-буфер — 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 ресуспендировали в 2,2 М 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 ресуспендировали в том же буфере.

Связывание альдостерона цитозольной фракцией определяли инкубируя 0,4 мл цитозола (содержание белка 2 кг) с различными концентрациями ^3H -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 ^3H -альдостерона. Для этого к пробам наряду с меченым 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 ^3H -альдостерона, который был преинкубирован с цитозолом 10 мин при 25 °C. После инкубации пробы помещали в ледяную баню, добавляли по 5 мл транс-сахарозного буфера и немедленно фильтровали через фильтры фирмы «Миллпор» 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-III, 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 ^3H -альдостерона оказалось, что цитозол старых крыс связывает меченый 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.

