вание альдостерона срезами надпочечников при добавлении ВАУ К 8644 не изменялось ни в низко-, ни в высококалиевой среде [4]. Однако биосинтез гормона диспергированными клетками активировался ВАУ К 8644 при субоптимальной концентрации K^+ и тормозился при оптимальной [11]. Сходные данные получены Balla и соавт. [7]. Необходимо отметить, что при концентрации K^+ 18 ммоль/л ВАУ К 8644 существенно подавлял образование гормона. Ранее нами исследовалась возможность применения вновь синтезированных ДГП для модулирования ответа коры надпочечников на K^+ [4]. Наиболее активным соединением оказался 2,6-диметил-3,5-ди-(этоксикарбонил)-4-(3′,4′-диметоксифенил)-1, 4-дигидропиридин (ДГП-51). Добавление 50 нмоль/л ДГП-51 полностью предупреждало стимуляцию синтеза альдостерона срезами надпочечников морских свинок [4]. Известно, что ингибиторы кальциевых каналов нитрендипин и нифедипин тормозят K^+-зависимую активацию биосинтеза альдостерона [6, 10].

Таким образом, использование агонистов и антагонистов кальциевых каналов позволяет получить ценные сведения о значении ионов Ca в регуляции секреции кортикостероидных гормонов. Важно отметить, что ДГП — ингибиторы кальциевых каналов (нитрендипин, нифедипин, форидон) — широко применяются в качестве гипотензивных и антиаритмических лекарств. Их влияние на синтез альдостерона и его регуляцию может, с одной стороны, составлять существенное звено лечебных эффектов, с другой, — явиться осложнением при лечении.

Цель работы — изучение изменений биосинтеза кортикостероидных гормонов при варьировании концентрации K^+ и модулировании функции кальциевых каналов с использованием различных ДГП.

Методика

Опыты проведены на самцах морских свинок массой 250—350 г. Животных декапитировали между 10 и 11 ч, надпочечники очищали от жира и соединительной ткани, с максимальной полнотой удаляли медуллярную зону и готовили срезы, толщиной 0,5—0,8 мм. Срезы инкубировали в 1 мл среды, содержащей фосфатный буфер Кребса—Рингера, 20 ммоль/л HEPES (pH 7,6), 1—11 ммоль/л K^+, 2 ммоль/л Ca^{2+}, 2 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) и производные 1,4-дигидропиридина (0—500 нмоль/л).

Для изучения скорости превращения [^{3}H]-холестерина в стероиды срезы (10—30 мг) преинкубировали с меченым предшественником 30 мин при 37 °C, после чего в среду вносили необходимые добавки, и инкубация продолжалась еще 25 мин. На пробу вносили 1 МБк неопределенномеченого [^{3}H]-холестерина. После инкубации пробы быстро охлаждали, срезы гомогенизировали в 2 мл буфера, содержащего 25 ммоль/л триэтаноламина (ТЭА)-HCl (pH 7,6), 25 ммоль/л KCl, 3 ммоль/л Mg-ацетата, 3 ммоль/л 2-меркаптоэтанола, 250 ммоль/л сахарозы, 0,1 ммоль/л фенилметилсульфонилфторида. Стероиды экстрагировали хлороформом. Перед хроматографированием в пробы вносили в качестве носителей стабильные гормоны. Разделение стероидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах марки SilufolUV 254. Хроматографирование проводили в двух направлениях, используя системы растворителей: хлороформ — этанол (97 : 3) и бензол — ацетон (65 : 35). Силикагель, содержащий стероиды, снимали с пластин, переносили во флаконы со сцинтилляционной жидкостью марки ЖС-8 и просчитывали радиоактивность в счетчике Mark III. Включение радиоактивных предшественников относили к 1 мг инкубированной ткани.

При определении образования альдостерона срезы (2—6 мг) инкубировали в течение 25 мин при 37 °C, гомогенизировали в буфере инкубации и измеряли концентрацию гормона с помощью радиоимму-

нологических наборов фирмы «Sorin Biomedica» (Италия). Определения проводили в трех параллелях.

Производные 1,4-дигидропиридина синтезировали, как указано ранее [4]. Все соли, NaOH, HCl — фирмы «Merck» (Германия), БСА, ТЭА — фирмы «Serva» (Германия), HEPES, 2-меркаптоэтанол, сахароза — фирмы «Bio-Rad» (США). Все остальные реактивы — отечественного производства.

Достоверность различий экспериментальных данных оценивали по Стьюденту и с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона — Манна—Уитни [2].

Результаты и их обсуждение

Образование альдостерона в коре надпочечников зависит от концентрации K^+. Повышение концентрации K^+ в инкубационной среде от 3 до 8 ммоль/л увеличивает синтез альдостерона в 1,5 раза (рис. 1: знаком «∧» отмечена достоверность отличий содержании при K^+ 3 и 8 ммоль, знаком «*» — достоверность отличий с добавлением ВАУ К 8644 и без него при 3 ммоль/л K^+). Влияние ВАУ К 8644 на образование альдостерона срезами коры надпочечников морских свинок

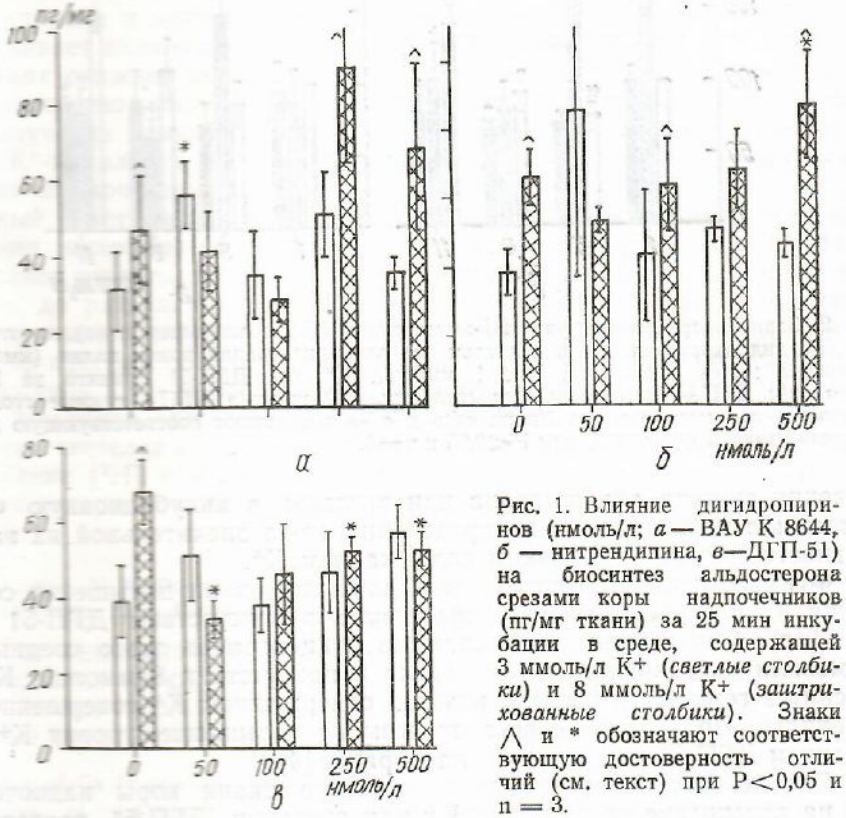

Рис. 1. Влияние дигидропиринов (нмоль/л; *а* — ВАУ К 8644, *б* — нитрендипина, *в*—ДГП-51) на биосинтез альдостерона срезами коры надпочечников (пг/мг ткани) за 25 мин инкубации в среде, содержащей 3 ммоль/л K^+ (*светлые столбики*) и 8 ммоль/л K^+ (*заштрихованные столбики*). Знаки ∧ и * обозначают соответствующую достоверность отличий (см. текст) при $P<0,05$ и $n = 3$.

определяется концентрацией K^+ в инкубационной среде и концентрацией используемого соединения (см. рис. 1, *а*). При низком содержании K^+ добавление 50 нмоль/л ВАУ К 8644 усиливает образование альдостерона, но более высокие его концентрации не влияют на биосинтез гормона в среде, содержащей 3 ммоль/л K^+. Интересные результаты дал анализ воздействия ВАУ К 8644 на стимуляцию стероидогенеза K^+. Повышение концентрации K^+ от 3 до 8 ммоль/л не активирует биосинтез альдостерона при 50 и 100 нмоль/л ВАУ К 8644, но существенно усиливает его при 250 и 500 нмоль/л ВАУ К 8644. На этом фоне образование альдостерона возрастает в 1,7—1,9 раза в ответ на

повышение содержания K^+. При использовании суперфузионной методологии ВАУ К 8644 (100 нмоль/л) активировал образование альдостерона при концентрации K^+ 5,4 ммоль/л, но тормозил синтез гормона, если содержание K^+ повышалось до 8,4—18,0 ммоль/л [7].

Менее выраженные изменения биосинтеза альдостерона наблюдались при внесении в инкубационную среду нитрендипина (см. рис. 1, *б*). В ответ на повышение содержания K^+ в среде срезы продуцировали повышенное количество альдостерона в контроле и в опыте на фоне добавления 100—500 нмоль/л нитрендипина. Результаты

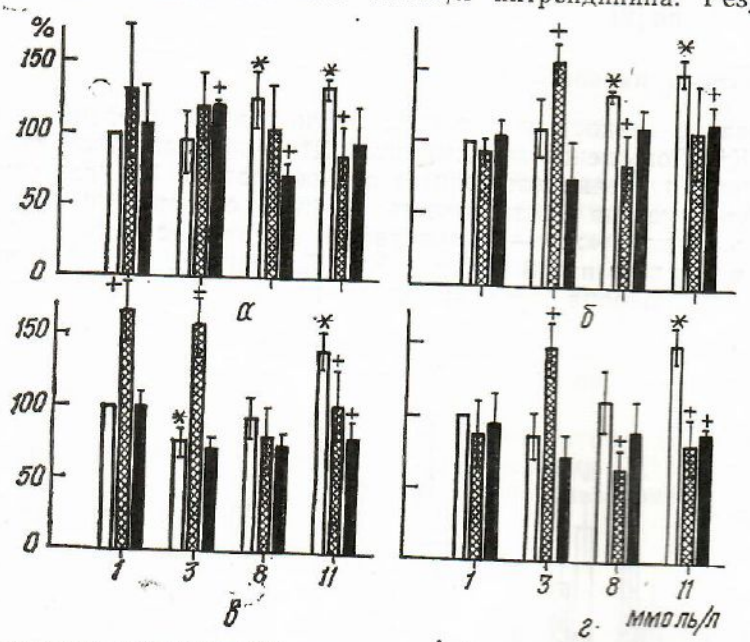

Рис. 2. Зависимость включения [^{3}H]-холестерина (%) в альдостерон (*а*), кортикостерон (*б*), гидрокортизон (*в*) и кортизон (*г*) от концентрации ионов калия (ммоль/л) включение метки в гормоны при 1 ммоль/л K^+ без ДГП-51 принято за 100 %. 50 нмоль/л ДГП — *заштрихованные столбики*, 500 нмоль/л ДГП — *темные столбики*, контроль — *светлые столбики*. Знаки «✳» и «+» обозначают соответствующую достоверность отличий (см. текст) при $P<0,05$ и $n=4$.

изучения синтеза альдостерона при внесении в инкубационную среду 50 нмоль/л нитрендипина неопределенны из-за значительной их вариабельности для проб с низким содержанием K^+.

Функциональный ответ коры надпочечников на повышение содержания K^+ в среде полностью подавлялся в присутствии ДГП-51 (см. рис. 1, *в*). Почти все использованные концентрации этого соединения тормозили образование альдостерона в присутствии 8 ммоль/л K^+, а биосинтез гормона в среде с низким содержанием K^+ совершенно не изменялся. Подавление ответа железы на повышение уровня K^+ под влиянием ДГП-51 наблюдалось нами ранее [4].

Дальнейший анализ подавления ответа ткани коры надпочечников на повышение содержания K^+ при введении ДГП-51 проведен с меченым предшественником всех стероидных гормонов — холестерином. Холестерин используется клетками для биосинтеза альдостерона и глюкокортикоидов — гидрокортизона и кортизона. Вследствие повышения содержания K^+ в среде до 8—11 ммоль/л происходило небольшое усиление включения метки в альдостерон в контрольных пробах (рис. 2, *а* — *светлые столбики;* на этом рисунке знак «✳» означает, что значение отличается от такового при 1 ммоль/л K^+ без ДГП, знак «+» — значение отличается от контроля при той же концентрации K^+). Незначительная активация синтеза альдостерона в этих условиях обусловлена коротким временем инкубации и наличием в адренокортикоцитах значительного запаса холестерина, что снижает использование

экзогенного меченого предшественника. Опыты с [^{3}H]-холестерином подтвердили, что ДГП-51 влияет на биосинтез альдостерона только при повышенной концентрации K^+ в среде (см. рис. 2, *а*). В результате добавления ДГП-51 в среду, содержавшую 8 и 11 ммоль/л K^+, включение [^{3}H] в альдостерон существенно подавляется, тогда как при 1 ммоль/л K^+ каких-либо изменений стероидогенеза не происходит.

Помимо альдостерона, нами исследовано мечение кортикостерона, который может выполнять роль промежуточного продукта при превращении холестерина в альдостерон [5]. Мечение кортикостерона при повышении содержания K^+ в инкубационной среде изменяется более выраженно, чем альдостерона. ДГП-51 угнетает включение метки [^{3}H]-холестерина, если сравнивать с контролем, когда образование кортикостерона (и альдостерона) стимулировалось высокой концентрацией K^+ (см. рис. 2, *б*). Так как образование альдостерона начинается с реакции отщепления боковой цепи холестерина и эта реакция является общей для биосинтеза всех стероидных гормонов, мы исследовали влияние ДГП-51 на включение метки холестерина в гидрокортизон и кортизон (см. рис. 2, *в*, *г*). Пути образования этих гормонов очень близки, этим обусловлено сходство наблюдаемых сдвигов. Мечение гидрокортизона и кортизона изменяется в том же плане, что и мечение альдостерона и кортикостерона. Повышение концентрации K^+ в среде увеличивает включение [^{3}H] в гормоны (см. рис. 2, *в*, *г*). ДГП-51 в этих условиях снижает использование [^{3}H]-холестерина.

Интересно сопоставить эти результаты с данными, полученными при изучении влияния блокатора Ca^{2+}-каналов верапамила и блокатора K^+-каналов 2-аминопиридина на образование 11-оксикортикостероидов надпочечниками крыс [1]. Оба блокатора снижали функциональный ответ ткани взрослых крыс на АКТГ. Сходство изменений мечения минерало- и глюкокортикоидов, вызываемых K^+ и ДГП-51, позволяет считать, что K^+ и ДГП-51 влияют на общие этапы стероидогенеза, до разделения путей биосинтеза. Наиболее вероятно, что этим общим этапом является десмолазная реакция, обеспечивающая образование прегненолона. Активация этой реакции вследствие повышения содержания K^+ в среде вызовет усиление биосинтеза всех кортикостероидов. Механизм, обеспечивающий активацию стероидогенеза ионами калия, чувствителен к ДГП-51, и подавление механизма активации снижает включение [^{3}H] в кортикостероиды до значений, наблюдаемых при низком содержании K^+ в среде инкубации.

N. D. Tronko, V. M. Pushkarev, I. S. Chelnakova,
L. N. Yarovaya, A. S. Mikosha

K^+-AIDED REGULATION OF HORMONE BIOSYNTHESIS IN ADRENALS OF GUINEA PIGS UNDER ACTION OF DIHYDROPYRIDINES. 1. AN ANLYSIS OF CHANGES IN STEROIDOGENESIS EVOKED BY DIHYDROPYRIDINES

Influence of Ca^{2+} channel modulators BAY K 8644, nitrendipine and newly synthesized derivative of 1,4-dihydropyridine: 4-(3′, 4′-dimethoxyphenyl)-2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine-(DHP-51) on aldosterone production by adrenocortical slices depends on K^+ content in the incubation medium. The modulators only slightly influence the hormone output at low K^+ level in the medium. Intensive synthesis of aldosterone at high level of potassium in the medium was prevented in the presence of DHP-51 and low concentration of BAY K 8644. DHP-51 inhibited [^{3}H] — cholesterol incorporation into all main corticosteroids in the high-potassium medium.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

стероидогенез изолированных надпочечников взрослых и старых крыс // Физиол. журн.—1990.—36, № 5.— С. 99—104.
2. *Гублер Е. В., Генкин А. А.* Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медикобиологических исследованиях.— М. : Медицина, 1969.—31 с.
3. *Костюк П. Г.* Кальций и клеточная возбудимость.— М. : Наука, 1986.—255 с.
4. *Тронько Н. Д., Пушкарев В. М., Ременников Г. Я. и др.* 1,4-дигидропиридины — возможные модуляторы секреции альдостерона корой надпочечных желез // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1989.— № 11.— С. 77—80.
5. *Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Булатов А. А. и др.* Биохимия гормонов и гормональной регуляции.— М. : Наука, 1976.—378 с.
6. *Aguilera G., Catt K. J.* Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium // Endocrinology.—1986.—118, N 1.— P. 112—118.
7. *Balla T., Varnai P., Hollo Z., Spat A.* Effect of high potassium concentration and dihydropyridine Ca^{2+}-channel agonists on cytoplasmic Ca^{2+} and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells // Ibid.—1990.—127, N 2.— P. 815—822.
8. *Barrett P. Q., Bollag W. B., Isalec C. M. et al.* Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion // Endocr. Rev.—1989.—10, N 4.— P. 496—518.
9. *Cohen C. J., McCarthy R. T., Barrett P. Q., Rasmussen H.* Ca^{2+} channels in adrenal glomerulosa cells: K^+ and angiotensin II increase T-type Ca^{2+} channel current // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.—1988.—85.— P. 2412—2416.
10. *Finkel M. S., Aguilera G., Catt K. J., Keiser H. R.* [^{3}H]nitrendipine binding to adrenal capsular membranes // Life Sci.—1984.—35, N 8.— P. 905—910.
11. *Hausdorff W. P., Aguilera G., Catt K. J.* Selective enhancement of angiotensis II- and potassium-stimulated aldosterone secretion by the calcium channel agonist BAY K 8644 // Endocrinology.—1986.—118, N 2.— P. 869—874.
12. *Kojima K., Kojima I., Rasmussen H.* Dihydropyridine calcium agonist and antagonist effects on aldosterone secretion // Amer. J. Physiol.— 1984.— 247.— P. E645—E650.
13. *Kojima I., Kojima K., Rasmussen H.* Role of calcium fluxes in the sustained phase of angiotensin II-mediated aldosterone secretion from adrenal glomerulosa cells // J. Biol. Chem.—1985.—260.— P. 9177—9184.
14. *McCarthy R. T., Fry H. K.* Nitrendipine block of calcium channel currents in vascular smooth muscle and adrenal glomerulosa sells // J. Cardiovasc. Pharmacol.—1988.—12 (Suppl. 4.).— P. 98—101.

Киев. ин-т эндокринологии и обмена веществ
М-ва здравоохранения Украины

Материал поступил
в редакцию 27.05.91

УДК 612.015.1+612.453.018

А. С. Микоша, В. М. Пушкарев, И. С. Челнакова, Г. Я. Ременников

Регуляция биосинтеза гормонов в надпочечных железах морских свинок ионами калия при действии дигидропиридинов

2. Возможные механизмы изменений стероидогенеза, вызываемых 1,4-дигидропиридинами, в диспергированных адренокортикоцитах

Образование альдостерона, кортикостерона, гидрокортизона и кортизона из меченого холестерина в диспергированных клетках коры надпочечников значительно усиливается при повышении концентрации K^+ в инкубационной среде. Включение метки в альдостерон и кортикостерон не изменяется в среде, содержащей 3 ммоль/л K^+, но подавляется при концентрации K^+ 8 ммоль/л в результате добавления 250 нмоль/л ДГП-51. Мечение 17-гидроксилированных кортикостероидов, гидрокортизона и кортизона, при низкой концентрации K^+ усиливалось, а при высокой снижалось вследствие добавления в инкуба-

© А. С. МИКОША, В. М. ПУШКАРЕВ, И. С. ЧЕЛНАКОВА, Г. Я. РЕМЕННИКОВ, 1991

ционную среду ДГП-51. Только при концентрации 500 нмоль/л эта зависимость нарушалась. Мечение белков адренокортикоцитов [^3H]-лейцином усиливалось при повышении концентрации K^+. ДГП-51 мало изменял включение лейцина в белки при низком уровне K^+, сильнее подавлял включение в среде с высоким уровнем K^+. ДГП-51 блокировал перенос Ca^{2+} в адренокортикоциты, вызываемый повышением уровня K^+ в среде. Обсуждается механизм воздействия ДГП-51 на регуляцию стероидогенеза в адренокортикоцитах.

Введение

Применение агонистов и ингибиторов кальциевых каналов позволило выяснить важные механизмы активации секреции альдостерона ангиотензином II [6]. Однако значение Ca^{2+} в стимуляции образования альдостерона при повышении уровня K^+ исследовано слабо. Опыты с ВАУ К 8644 свидетельствуют о том, что K^+ вызывает быстрое, но небольшое повышение содержания Ca^{2+} в клетках клубочковой зоны, которое потенцируется агонистом [9]. Анализ изменений переноса Ca^{2+}, вызываемых ДГП, показал, что эффекты ДГП связаны с их оптической изомерией. Ассиметрия 4-го углерода обеспечивает существование двух энантиомеров для каждого соединения и для ряда ДГП энантиомеры уже удалось разделить. Электрофизиологический анализ свидетельствует, что кальциевый агонизм и антагонизм присущ разным изомерам [7], в частности, (—) ВАУ К 8644 является агонистом, (+) ВАУ К 8644 — слабым антагонистом кальциевых каналов [8]. Количественное преобладание агонистических свойств обеспечивает агонистическое воздействие обычно применяемого рацемата ВАУ К 8644. Однако конечный эффект ДГП может, вероятно, меняться при количественных вариациях или в различные сроки наблюдения.

Влияние K^+ на биосинтез альдостерона связано с синтезом быстрометящихся белков [1, 2, 5]. Естественно предполагать, что ДГП, модулируя кальциевый перенос, будут вызывать соответствующие изменения белкового синтеза. В связи с этим мы исследовали характеристики изменений биосинтеза кортикостероидов, белков и содержания Ca^{2+}, вызываемые ДГП на диспергированных клетках коры надпочечников морских свинок.

Методика

В первом сообщении описаны основные методические приемы, поэтому в этом — мы ограничимся описанием неохарактеризованных методик.

Очищенные диспергированные клетки коры надпочечников морских свинок получали с использованием коллагеназы [4]. При изучении стероидогенеза $5 \cdot 10^5$ клеток инкубировали с [^{3}H]-холестерином, как описано ранее для срезов. После завершения инкубации, разделения стероидов и измерения радиоактивности включение метки рассчитывали на 10^6 клеток. Скорость белкового синтеза в клетках определяли по включению [^{3}H]-лейцина. Клетки ($40—100 \cdot 10^3$) инкубировали в течение 20 мин при 37 °С с добавлением 0,04 МБк/мл меченой аминокислоты в том же буфере, что и срезы. Включение метки в белки оценивали по ранее описанной методике [3].

Изучая перенос [$^{45}Ca^{2+}$], инкубировали клетки в течение 30 мин при 37 °С в фосфатном буфере Кребса — Рингера, содержащем 1 ммоль/л K^+ и 0,1 МБк [^{45}Ca]$CaCl_2$, затем концентрацию K^+ повышали до 8 ммоль/л, добавляли ДГП-51 (250 нмоль/л) в опытную пробу и продолжали инкубацию. Через 1, 2, 5, 10, 20 и 30 мин отбирали аликвоты, быстро охлаждали и осаждали на фильтры марки GF/C. Фильтры промывали холодным физиологическим раствором, содержащим 5 ммоль/л $CaCl_2$ и просчитывали в стандартном толуольном сцинтилляторе в счетчике типа Mark III.