

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 кальцевый 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 быстро разрушающихся белков [1, 2, 5]. Естественно предполагать, что ДГП, модулируя кальцевый 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 [^3H]-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 [^3H]-лейцина. Клетки ($40-100 \cdot 10^3$) инкубировали в течение 20 мин при 37°C 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 [$^{45}\text{Ca}^{2+}$], инкубировали клетки в течение 30 мин при 37°C 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 толуальном сцинтилляторе в счетчике типа Mark III.

Результаты

Анализ характера и механизмов влияния ДГП-51 на стероидогенез мы проводили на суспензии аденокортикоцитов морских свинок. Исследовано использование $[^3\text{H}]$ -холестерина для синтеза кортикостероидных гормонов при двух концентрациях K^+ в инкубационной среде. Выбор концентраций определялся необходимостью сопоставить образование гормонов при физиологическом ее значении (3 ммоль/л) и при концентрации, стимулирующей гормонотропиз (8 ммоль/л). Повышение

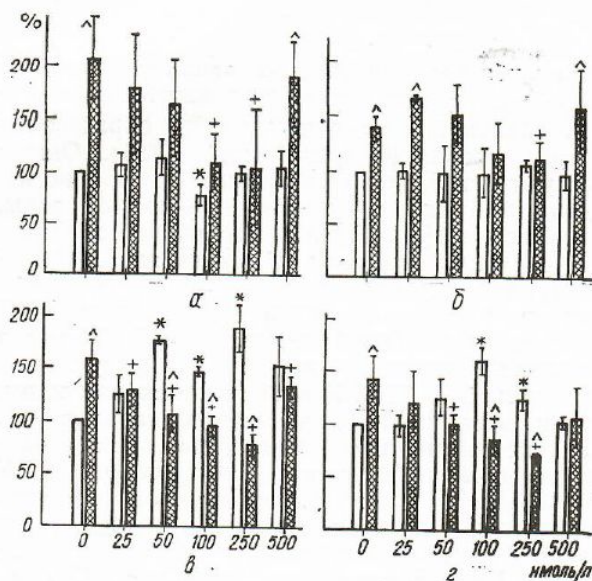


Рис. 1. Включение $[^3\text{H}]$ -холестерина в кортикостероидные гормоны (а — альдостерон, б — кортикостерон, в — гидрокортизон, г — кортизон) при инкубации аденокортикоцитов в среде, содержащей 3 ммоль/л K^+ (светлые столбики) и 8 ммоль/л K^+ (заштрихованные столбики), в зависимости от концентрации (нмоль/л) ДГП-51 (мечение стероидов в среде, содержащей 3 ммоль/л K^+ без ДГП-51 принято за 100 %).

содержания K^+ вызывало двукратное усиление мечения альдостерона изолированными клетками коры надпочечников (рис. 1, а; на этом рисунке знак « $\wedge$ » означает, что $P < 0,05$ для значений стероидогенеза при 3 и 8 ммоль/л K^+ ; знак «*» — что $P < 0,05$ для проб с добавлением ДГП-51 и без него при концентрации K^+ 3 ммоль/л; знак «+» — что $P < 0,05$ для проб с добавлением ДГП-51 и без него при концентрации K^+ 8 ммоль/л). Внесение в среду инкубации ДГП-51 в концентрациях от 25 до 250 нмоль/л почти не воздействовало на базальный синтез альдостерона, но снижало стимулированную продукцию гормона. При содержании K^+ в среде 8 ммоль/л подавление зависело от концентрации ДГП-51 и было максимальным при 100—250 нмоль/л. Дальнейшее увеличение концентрации ДГП-51 до 500 нмоль/л вызывало активацию мечения. Включение $[^3\text{H}]$ в среде, содержащей 8 ммоль/л K^+ , восстанавливалось до его контрольных значений.

Сходная картина наблюдалась при изучении мечения кортикостерона (см. рис. 1, б). В среде, содержащей 3 ммоль/л K^+ , ДГП-51 не изменял синтез гормона. В концентрации 250 нмоль/л он тормозил образование кортикостерона при 8 ммоль/л K^+ . Самая высокая концентрация ДГП-51 не влияла на включение метки холестерина в кортикостерон.

Интересная особенность обнаружена при изучении биосинтеза гидрокортизона и кортизона. Мечение этих гормонов при низкой концентрации K^+ усиливалось, а при высокой — снижалось вследствие добавления в инкубационную среду повышающихся концентраций ДГП-51 (см. рис. 1, в, г). Только при достижении концентрации 500 нмоль/л эта зависимость нарушалась. Дозависимое подавление ДГП-51 образования гидрокортизона и кортизона при высокой концентрации K^+ в среде аналогично снижению биосинтеза альдостерона и кортикостерона.

Однако активация мечения гидрокортизона и кортизона при низкой концентрации K^+ и добавлении ДГП-51 для других соединений не характерна и ранее не наблюдалась.

Активация биосинтеза альдостерона при повышении концентрации K^+ связана с образованием быстрометящихся белков и подавляется ингибиторами белкового синтеза [5]. В связи с этим мы исследовали зависимость биосинтеза быстрометящихся белков от наличия ДГП-51

и близких ему по структуре ДГП (рис. 2; на этом рисунке знак « $\wedge$ » означает, что $P < 0,05$ для значений показателей биосинтеза при содержании K^+ 1 и 10 ммоль/л; знак «*» — что $P < 0,05$, а знак «**» — что $P < 0,01$ для значений, полученных для проб с добавлением ДГП и без них при содержании K^+ 1 ммоль/л; знаки «+» и «++» — что $P < 0,05$ и $P < 0,01$ соответственно для значений, полученных для проб с добавлением ДГП и без них при содержании K^+ 10 ммоль/л). Включение метки в белки адренокортикоцитов суще-

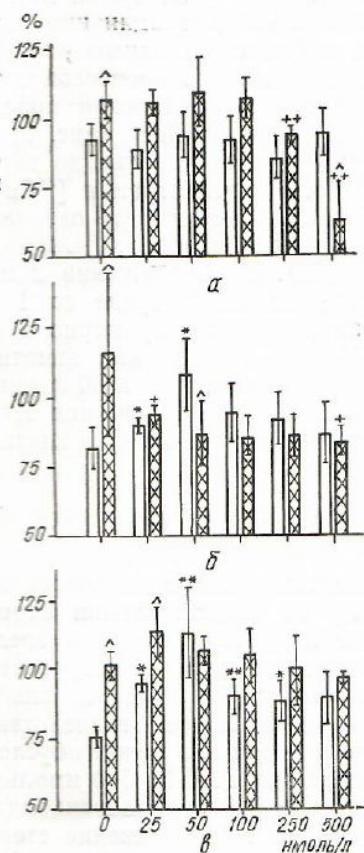
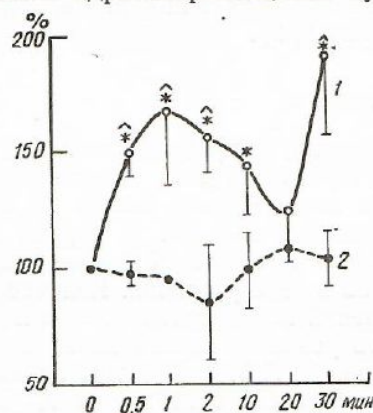


Рис. 2. Включение $[^3H]$ -лейцина в белки адренокортикоцитов, инкубированных в среде, содержащей 1 ммоль/л K^+ (светлые столбики) и 10 ммоль/л K^+ (заштрихованные столбики), в зависимости от концентрации (ммоль/л) модуляторов кальциевых каналов (а — ДГП-51, б — ВАУ К 8644, в — нитрендипина).

Рис. 3. Включение $[^{45}Ca^{2+}]$ (% исходной радиоактивной метки) в диспергированные адренокортикоциты при повышении содержания K^+ в среде до 8 ммоль/л (1 — контроль, 2 — опыт, добавление ДГП-51). Остальные обозначения см. в тексте.



ственно усиливалось в среде с высоким содержанием K^+ . При добавлении в среду 25—100 нмоль/л ДГП-51 это отличие перестает подтверждаться статистически (см. рис. 2, а). Максимальная концентрация ДГП-51 значительно тормозит мечение белков, если в среде содержится 10 ммоль/л K^+ . Интересно отметить, что в сходных условиях биосинтез альдостерона и кортикостерона из холестерина значительно возрастает. В оценке физиологических эффектов дигидропиридинов основное внимание уделяется их влиянию на кальцевые каналы, поэтому мы сопоставили полученные результаты с результатами применения известного кальцевого агониста — ВАУ К 8644 (см. рис. 2, б). Оказалось, что в низкокалиевой среде ВАУ К 8644 в концентрациях 25—50 нмоль/л усиливает синтез белка в адренокортикоцитах, а в среде, обогащенной K^+ , снижает его. Эти эффекты становятся менее выраженными при дальнейшем повышении концентрации ВАУ К 8644. Наблюдаемые сдвиги в какой-то мере сходны с изменениями мечения гидрокортизона и кор-

тизона, вызываемыми ДГП-51 (см. рис. 1, в, г). Изменения биосинтеза белков, вызываемые ВАУ К 8644, были сопоставлены со сдвигами, обусловленными блокаторм кальциевых каналов, нитрендипином, также принадлежащим к дигидропиридинам (см. рис. 2, в). Нитрендипин, так же как и ВАУ К 8644, существенно усиливал мечение белков, синтезируемых в низкокальциевой среде, но в отличие от ВАУ К 8644 совершенно не подавлял белковый синтез в высококальциевой среде. Максимальная активация мечения наблюдалась при концентрации нитрендипина 50 нмоль/л в результате инкубации адренокортикоцитов в среде, содержащей 1 ммоль/л K^+ . Учитывая важнейшую роль процессов транспорта Ca^{2+} в реализации активационных воздействий, нами прослежено воздействие ДГП-51 на K^+ -зависимый перенос Ca^{2+} (рис. 3; за 100 % принято содержание в клетках $[^{45}Ca^{2+}]$ непосредственно перед внесением K^+ ; знак «*» означает, что значения концентрации $[^{45}Ca^{2+}]$ достоверно отличаются от исходного при $P < 0,05$; знак «^» означает, что значения показателя достоверно отличаются в точках контрольной — 1 и опытной — 2 кривых при $P < 0,05$). На протяжении 2 мин после повышения концентрации K^+ в инкубационной среде от 1 до 8 ммоль/л содержание $[^{45}Ca^{2+}]$ в клетках возрастает примерно в 1,5 раза. Оно остается повышенным около 10 мин. Необходимо отметить повторное повышение содержания $[^{45}Ca^{2+}]$, происходящее к 30-й минуте инкубации. При добавлении ДГП-51 повышение содержания K^+ в среде не вызывает никаких изменений концентрации $[^{45}Ca^{2+}]$ в клетках (см. рис. 3, 2).

Обсуждение

Результаты, полученные нами на адренокортикоцитах с использованием $[^3H]$ -холестерина, подтвердили данные об ингибировании ответа срезов коры надпочечников на повышение концентрации K^+ в среде, содержащей ДГП-51. В первом сообщении представлены результаты, свидетельствующие об уменьшении количества образующегося альдостерона в этих условиях. Конечно, клетки чувствительнее к воздействию изменений концентрации ионов и ДГП, чем срезы, и это может обуславливать различие ответа на K^+ при концентрации ДГП-51 500 нмоль/л. Так как ДГП-51 полностью блокирует вход Ca^{2+} в адренокортикоциты при повышении содержания K^+ в среде (см. рис. 3), снижение стероидогенного ответа на K^+ (см. рис. 1, а) является закономерным ответом клеток на добавление ДГП-51. Сходные изменения наблюдаются и в мечении остальных стероидов при этой концентрации K^+ . Это позволяет считать, что активация стероидогенеза при высоком содержании K^+ осуществляется на его ранних этапах, общих для глюко- и минералокортикоидов. Ранее мы предположили, что активация биосинтеза осуществляется на этапе отщепления боковой цепи холестерина [5].

Воздействие ДГП-51 на стероидогенез, возможно, не исчерпывается торможением входа Ca^{2+} . При низкой концентрации K^+ повышение содержания ДГП-51 до 50—100 нмоль/л активирует биосинтез глюкокортикоидов (см. рис. 1, в, г). Так как соотношение синтеза глюко- и минералокортикоидов определяется в значительной мере соотношением активностей 21- и 17 α -гидроксилаз, то это наблюдение может указывать на некоторое торможение 21-гидроксилазы ДГП-51. О механизме этого торможения трудно сказать что-либо определенное, но имеется интересное сообщение Riddick и соавт. [10, 11] об инактивации цитохрома P 450 соединениями, отличающимися от ДГП-51 алкильным заместителем в положении 4. Так как все гидроксилазы стероидов содержат цитохром P-450, но отличаются по ряду параметров, не исключено, что именно 21-гидроксилаза наиболее чувствительна к ДГП-51.

Важной особенностью воздействия ДГП-51 является существенное подавление включения метки лейцина в белки адренокортикоцитов при высокой концентрации K^+ и добавлении 250—500 нмоль/л ДГП-51.

В таких условиях изменение синтеза белков, очевидно, отражает какое-либо интенсивное воздействие ДПП-51 на белоксинтезирующий аппарат и не связано с регуляторным влиянием ДПП-51 на биосинтез кортико-стероидов.

A. S. Mikosha, V. M. Pushikarev, I. S. Chelnakova, G. Ya. Remennikov

**K⁺-AIDED REGULATION OF HORMONE BIOSYNTHESIS
IN ADRENALS OF GUINEA PIGS UNDER ACTION OF DIHYDROPYRIDINES.
POSSIBLE MECHANISMS OF CHANGES IN STEROIDOGENESIS INDUCED BY
1,4-DIHYDROPYRIDINES IN DISPERSED ADRENOCORTICOCYTES**

Formation of aldosterone, corticosterone, cortisol and cortisone of labelled cholesterol in the dispersed adrenocorticotocytes significantly intensifies at high potassium concentrations in the incubation medium. Labelling of aldosterone and corticosterone in the presence of DHP-51 remains unchanged in the medium containing 3 mmol/l of K⁺, but is inhibited at 8 mmol/l of potassium. Labelling of 17-hydroxylated corticosteroids, cortisol and cortisone grows at low K⁺ concentration and falls at the high concentration as a result of DHP-51 addition to the incubation medium. This relationship is disturbed only at high concentration of DHP-51. Incorporation of [³H]—leucine into proteins of adrenocorticotocytes grows with K⁺ concentrations. DHP-51 causes insignificant changes in incorporation of [³H]-leucine into proteins at low potassium content, inhibiting incorporation in the medium at high K⁺ level. DHP-51 blocked Ca²⁺ transport into adrenocorticotocytes, activated by raised level of potassium in the medium. The mechanism of DHP-51 action on regulation of steroidogenesis in adrenocorticotocytes is discussed.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С., Комиссаренко В. П. Влияние ионов калия на синтез быстрометящихся белков в срезах надпочечников морских свинок // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1987.— № 2.— С. 61—63.
2. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Влияние концентрации K⁺ на скорость синтеза быстрометящихся белков в коре надпочечников // Биохимия. — 1987.—52, № 7.— С. 1174—1179.
3. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Участие цАМФ в регуляции минералокортикоидной функции надпочечников ионами калия // Там же.—1989.—54, № 2.— С. 323—327.
4. Тронько Н. Д., Пушкарёв В. М., Богданова Т. И. и др. Получение и фракционирование в градиенте перколлы клеток коры надпочечников морских свинок и характеристика их функционального состояния // Физиол. журн.—1989.—35, № 4.— С. 52—61.
5. Челнакова И. С., Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Участие белкового синтеза в K⁺-зависимой активации биосинтеза гормонов в коре надпочечников морских свинок // Пробл. эндокринологии.—1990.—36, № 6.— С. 64—68.
6. Barrett P. Q., Bollag W. B., Isalec C. M. et al. Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion // Endocrinol. Rev.—1989.—10, N 4.— P. 496—518.
7. Bechem M., Schramm M. Electrophysiology of dihydropyridine calcium agonists // The calcium channel: structure, function and implications / Eds. Morad, Nayler, Kazda, Schramm.—Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.—1988.— P. 63—70.
8. Engeart J. J., Biagi B., Day R. N. Opposing actions by Bay K 8644 enantiomers on calcium current, prolactin secretion, and synthesis in pituitary cells // Mol. endocrinol.—1990.—4, N 5.— P. 727—735.
9. Hausdorff W. P., Catt K. J. Activation of dihydropyridine-sensitive calcium channels and biphasic cytosolic calcium responses by angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells // Endocrinology.—1988.—123, N 6.— P. 2818—2826.
10. Riddick D. S., Mackie J. E., Massey T. E., Marks G. S. 3,5-Diethoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-ethyl-1,4-dihydropyridine inactivates rat liver cytochrome P-450 c, but not its orthologue, rabbit lung form 6 // Can. J. Physiol. and Pharmacol.—1990.—68.— P. 370—373.
11. Riddick D. S., Park S. S., Gelboin H. V., Marks G. S. Effects of 4-alkyl analogues of 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine on hepatic cytochrome P-450 heme, apoproteins, and catalytic activities following in vivo administration to rats // Mol. Pharmacol.—1990.—37.— P. 130—136.

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

Материал поступил
в редакцию 27.05.91

В таких условиях изменение синтеза белков, очевидно, отражает какое-либо интенсивное воздействие ДГП-51 на белоксинтезирующий аппарат и не связано с регуляторным влиянием ДГП-51 на биосинтез кортикостероидов.

A. S. Mikosha, V. M. Pushkarev, I. S. Chelnakova, G. Ya. Remennikov

K⁺-AIDED REGULATION OF HORMONE BIOSYNTHESIS
IN ADRENALS OF GUINEA PIGS UNDER ACTION OF DIHYDROPYRIDINES.
POSSIBLE MECHANISMS OF CHANGES IN STEROIDOGENESIS INDUCED BY
1,4-DIHYDROPYRIDINES IN DISPERSED ADRENOCORTICOCYTES

Formation of aldosterone, corticosterone, cortisol and cortisone of labelled cholesterol in the dispersed adrenocorticoocytes significantly intensifies at high potassium concentrations in the incubation medium. Labelling of aldosterone and corticosterone in the presence of DHP-51 remains unchanged in the medium containing 3 mmol/l of K⁺, but is inhibited at 8 mmol/l of potassium. Labelling of 17-hydroxylated corticosteroids, cortisol and cortisone grows at low K⁺ concentration and falls at the high concentration as a result of DHP-51 addition to the incubation medium. This relationship is disturbed only at high concentration of DHP-51. Incorporation of [³H] — leucine into proteins of adrenocorticoocytes grows with K⁺ concentrations. DHP-51 causes insignificant changes in incorporation of [³H]-leucine into proteins at low potassium content, inhibiting incorporation in the medium at high K⁺ level. DHP-51 blocked Ca²⁺ transport into adrenocorticoocytes, activated by raised level of potassium in the medium. The mechanism of DHP-51 action on regulation of steroidogenesis in adrenocorticoocytes is discussed.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С., Комиссаренко В. П. Влияние ионов калия на синтез быстрометящихся белков в срезах надпочечников морских свинок // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1987.— № 2.— С. 61—63.
2. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Влияние концентрации K⁺ на скорость синтеза быстрометящихся белков в коре надпочечников // Биохимия. — 1987.— № 7.— С. 1174—1179.
3. Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Участие цАМФ в регуляции минералокортикоидной функции надпочечников ионами калия // Там же.—1989.— № 54, № 2.— С. 323—327.
4. Тронько Н. Д., Пушкарёв В. М., Богданова Т. И. и др. Получение и фракционирование в градиенте перколлы клеток коры надпочечников морских свинок и характеристика их функционального состояния // Физиол. журн.—1989.— № 4.— С. 52—61.
5. Челнакова И. С., Пушкарёв В. М., Тронько Н. Д., Микоша А. С. Участие белкового синтеза в K⁺-зависимой активации биосинтеза гормонов в коре надпочечников морских свинок // Пробл. эндокринологии.—1990.— № 6.— С. 64—68.
6. Barrett P. Q., Bollag W. B., Isalec C. M. et al. Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion // Endocrinol. Rev.—1989.— № 10, N 4.— P. 496—518.
7. Bechem M., Schramm M. Electrophysiology of dihydropyridine calcium agonists // The calcium channel: structure, function and implications / Eds. Morad, Nayler, Kazda, Schramm.—Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.—1988.— P. 63—70.
8. Enyeart J. J., Biagi B., Day R. N. Opposing actions by Bay K 8644 enantiomers on calcium current, prolactin secretion, and synthesis in pituitary cells // Mol. endocrinol.—1990.— № 4, N 5.— P. 727—735.
9. Hausdorff W. P., Catt K. J. Activation of dihydropyridine-sensitive calcium channels and biphasic cytosolic calcium responses by angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells // Endocrinology.—1988.— № 123, N 6.— P. 2818—2826.
10. Riddick D. S., Mackie J. E., Massey T. E., Marks G. S. 3,5-Diethoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-ethyl-1,4-dihydropyridine inactivates rat liver cytochrome P-450 c, but not its orthologue, rabbit lung form 6 // Can. J. Physiol. and Pharmacol.—1990.— № 68.— P. 370—373.
11. Riddick D. S., Park S. S., Gelboin H. V., Marks G. S. Effects of 4-alkyl analogues of 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine on hepatic cytochrome P-450 heme, apoproteins, and catalytic activities following in vivo administration to rats // Mol. Pharmacol.—1990.— № 37.— P. 130—136.

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

Материал поступил
в редакцию 27.05.91