

І.П.Пастер, М.Д.Тронько

Вплив хлодитану на синтетичні процеси в клітинах надниркових залоз новонароджених поросят

В опытах на первичной культуре клеток надпочечных желез проведено изучение влияния хлодитана как специфического ингибитора функции коры надпочечников на синтетические процессы в адренокортикоцитах новорожденных поросят, органные и клеточные культуры которых находят все более широкое применение в качестве трансплантационного материала при лечении хронической надпочечниковой недостаточности. Показано, что инкубация адренокортикоцитов с хлодитаном (конечная концентрация в среде культивирования - 1-10000 нг/мл) на протяжении 24 ч оказывает выраженное отрицательное дозозависимое влияние на показатели включения ^3H -тимидина и ^3H -уридина в нуклеиновые кислоты, которые при максимальной концентрации препарата составили 16,9 и 46,0 % соответственно. Достоверный эффект хлодитана на показатели включения ^3H -лейцина (синтез белка) установлен только для концентраций 10-100 нг/мл и составляет около 70 % от контроля. Обсуждается возможный механизм действия хлодитана на синтетические процессы в клетках надпочечных желез.

Вступ

Хлодитан (2-о-хлорфеніл-2-п-хлорфеніл-1,1-дихлоретан, о,п'-ДДД) як специфічний інгібітор функції кори надниркових залоз використовується в клінічній практиці при хворобі та синдромі Іценко-Кушінга, а також гормонально-активних пухлинах кори надниркових залоз (кортикостеромах) [3, 6, 7]. Однак ефективність його застосування дуже варіабельна і залежить від багатьох обставин (зокрема, від біологічного виду надниркової тканини та умов її застосування) [3,8]. Важливим є вивчення впливу хлодитану на надниркові залози новонароджених поросят, органні та клітинні культури котрих знаходять усе більш широке застосування як трансплантаційного матеріалу при лікуванні хронічної надниркової недостатності після тотальної адреналектомії з приводу хвороби Кушінга, видалення пухлин кори надниркових залоз і хромафінної тканини; тяжкої та середньої форми хвороби Аддісона; бронхіальної астми, неспецифічного поліартриту, колагенозів, при яких потрібна тривала глюкокортикоїдна терапія і внаслідок гормонального лікування виникла вторинна надниркова недостатність [14].

Метою нашої роботи було вивчення впливу хлодитану на синтез нуклеїнових кислот і білка в первинній культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят.

Методика

Свіжовидалені надниркові залози очищали від жирової та сполучної тканин, після чого промивали охолодженим середовищем 199 (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів, Росія), яке містило антибіотики (100 ОД бензил-пеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату з розрахунку на 1 мл середовища). Потім залози розрізали на шматочки розміром 1-2 мм³ і піддавали послідовному впливу по 30 хв на водяній бані при 37 °С при постійному перемішуванні: спочатку 0,125 %-м розчином трипсину (Науково-виробниче об'єднання "Вирион", Росія), а потім 0,1 %-м розчином колагенази (фірми "Merck", Німеччина). Надосадову суспензію клітин збирали у флакон з охолодженим середовищем 199, яке містило 15 % ембріональної телячої сироватки крові (Науково-виробниче підприємство "Сангва", Україна) та антибіотики, а залишок тканини знову піддавали дії колагенази. Вказану процедуру повторювали 2-3 рази, після чого отриману суспензію клітин промивали декілька разів. Профільтровані адреноцити засівали в пробірки по 10⁶ клітин у 1 мл середовища культивування (середовище 199, яке містило 15 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки крові та антибіотики). Культивування проводили в атмосфері повітря в термостаті при 37 °С. Середовище культивування змінювали на 2-гу та 5-ту добу. Хлодитан* розчинений в спирту, вносили в середовище в дозі 1, 10, 100, 1000 і 10000 нг із розрахунку на 1 мл в об'ємі 100 мкл на 5-ту добу культивування. В контрольні проби вносили такий же об'єм спирту. Через 24 год для вивчення синтезу нуклеїнових кислот і білка адреноцити інкубували з ³Н-тимідином (37 кБк/мл) протягом 3 год, а також ³Н-уридином (37 кБк/мл) і ³Н-лейцином (37 кБк/мл) протягом 1 год, після чого моношар промивали декілька разів охолодженим 0,9%-м розчином NaCl і диспергували розчином Версену. Після відбору аліквоти для визначення кількості клітинного білка [18] нуклеїнові кислоти і білок осаджували охолодженим розчином трихлороцтової кислоти (кінцева концентрація - 5 %) на мембранні фільтри GF/C (фірми "Whatman Ltd.", Великобританія), які промивали послідовно кілька разів охолодженим 5 %-м розчином трихлороцтової кислоти та етанолом. Радіоактивність визначали в стандартному толуольному сцинтиляторі на бета-лічильнику "Beckman LS5000TA" (фірми "Beckman", США).

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента та критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати

Проведені нами дослідження показали, що інкубація клітин надниркових залоз новонароджених поросят з хлодитаном протягом 24 год

* Синтез здійснено керівником лабораторії оргсинтезу та хімреактивів Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України доктором хімічних наук Бальоном Я.Г.

Вплив хлодитану на включення (ін-
лейнових кислот і білка в культивовані

Концентрація хлоди- тану в середовищі культивування, нг/мл	³ Н-тимідин
0	953 ± 151 (10)
1	648 ± 152 (68)
10	349 ± 42 (36)
100	199 ± 25 (20)
1000	206 ± 10 (21)
10000	161 ± 19 (16)

* P<0,001, ** P<0,01, *** P<0,02, **** P<0,0001

пригнічує включення тимідин-
білок відповідно (таблиця).
в групі клітин, що інкубува-
інкорпорації тимідину стає
препарату 10 нг/мл, а вже
п'ятикратне зниження включе-
стає вірогідним його вплив на
виразний (42 %-не знижен-
сується показників інкорпора-
них (на відміну від показни-
кислоти) дозозалежного ефек-
реєструється при концентрації
близько 70 % від контролю.

Обговорення

Для вивчення впливу хлодитану
який забезпечує безпосередній
культуральному середовищі пр-
мальну діючу концентрацію.
структуру кори надниркових
сумніву [2, 8, 11, 19, 20].
показана здатність хлодитану
шурів [8], яка до цього важ-
препарату [13]. На думку де
накопиченням препарату надни-
виду при введенні хлодитану і

У той же час цілком випр-
досліджень з використанням б-
дури інкубації зрізів наднир-
сперименту з тканиною собак
на утворення кортикостероїдів.

Вплив хлодитану на включення ($\text{імл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$) попередників в синтезу нуклеїнових кислот і білка в культивовані клітини надниркових залоз ($M \pm m, n = 5$)

Концентрація хлодитану в середовищі культивування, нг/мл	Включення		
	^3H -тимідину	^3H -уридину	^3H -лейцину
0	$953 \pm 151 (100,0)$	$252 \pm 30 (100,0)$	$61,0 \pm 5,7 (100,0)$
1	$648 \pm 152 (68,0)$	$217 \pm 55 (86,1)$	$56,6 \pm 1,4 (92,8)$
10	$349 \pm 42 (36,6)^{**}$	$182 \pm 8 (72,2)$	$43,8 \pm 3,6 (71,8)^{****}$
100	$199 \pm 25 (20,9)^{**}$	$146 \pm 10 (57,9)^{***}$	$42,5 \pm 4,5 (69,7)^{****}$
1000	$206 \pm 10 (21,6)^{**}$	$132 \pm 30 (52,4)^{****}$	$46,2 \pm 4,3 (75,7)$
10000	$161 \pm 19 (16,9)^*$	$116 \pm 19 (46,0)^{**}$	$48,1 \pm 1,9 (78,8)$

* $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,02$, **** $P < 0,05$ в

пригнічує включення тимідину, уридину та лейцину в ДНК, РНК і білок відповідно (таблиця). Найбільш виразний ефект спостерігається в групі клітин, що інкубувалися з тимідином, і в якій послаблення інкорпорації тимідину стає достовірним, починаючи з концентрації препарату 10 нг/мл, а вже при концентрації 100 нг/мл реєструється п'ятикратне зниження включення. При цій же концентрації хлодитану стає вірогідним його вплив на інкорпорацію уридину, однак він менш виразний (42 %-не зниження порівняно з контролем). Що ж стосується показників інкорпорації лейцину, то хлодитан не чинить на них (на відміну від показників включення попередників у нуклеїнові кислоти) дозозалежного ефекту, а достовірний результат ($P < 0,05$) реєструється при концентраціях препарату 10-100 нг/мл і становить близько 70 % від контролю.

Обговорення

Для вивчення впливу хлодитану використано метод культури клітин, який забезпечує безпосередній контакт адреноцитів з розчинним у культуральному середовищі препаратом і дозволяє створити його оптимальну діючу концентрацію. Прямий ефект хлодитану на функцію і структуру кори надниркових залоз *in vitro* не викликає жодного сумніву [2, 8, 11, 19, 20]. Саме в дослідях *in vitro* була вперше показана здатність хлодитану впливати на тканину надниркових залоз шурів [8], яка до цього вважалася нечутливою до кортикостероїдної дії препарату [13]. На думку деяких авторів, це зумовлено недостатнім накопиченням препарату надниркових залоз тканиною у тварин цього виду при введенні хлодитану *in vivo* [8].

У той же час цілком зиправдана відмова від проведення вказаних досліджень з використанням більш зручної в технічному плані процедури інкубації зрізів надниркових залоз, оскільки за таких умов експерименту з тканиною собак не вдалося виявити ефекту хлодитану на утворення кортикостероїдів. Вважається, що при цьому певне зна-

чення має здатність препарату проникати всередину зрізу, а також площа його контакту з поверхнею тканинних елементів кори надниркових залоз [8, 19]. Проведені раніше дослідження на моношарових клітинних культурах надниркових залоз людського ембріона (5-7 міс) і новонароджених собак показали, що цитотоксичні дози хлодитану (на основі визначення відсотка морфологічного ушкодження клітин) становлять: ЦТД₀ - 8 і 2, ЦТД₅₀ - 32 і 12, ЦТД₁₀₀ - 72 і 28 мкг/мл [2]. При цьому найбільш чіткі зміни ліпідного обміну та активності сукциндегідрогенази і цитохромоксидази в секреторних клітинах і фібробластах знайдені при ЦТД₅₀ [2], а при 4 мкг/мл препарат викликає порушення механізму виділення ліпідів з клітини собак, а також значне зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 3 β -ол-стероїддегідрогенази (одного з ключових ферментів стероїдогенезу епітеліальних клітин) [11].

При додаванні хлодитану в концентрації 8 мкг/мл до моношарової культури адреноцитів плодів людини спостерігається зниження кортикостероїдної відповіді на АКТГ, а при 16-64 мкг/мл дегенеративні зміни клітин супроводжуються зниженням базальної продукції кортизолу та пригніченням стероїдогенного ефекту АКТГ [20]. Пригнічуючий ефект хлодитану на продукцію кортикостероїдів гомогенатами надниркових залоз людини, собак, курчат і навіть шурів (останні за умов *in vivo* нечутливі до кортиколітичної дії препарату) проявляється при концентрації 3-6 мкмоль, а при 18 мкмоль спостерігається повна блокада біосинтезу гормонів [8]. Однак при ретроградній перфузії надниркових залоз собак майже повна відсутність їх реакції на АКТГ відмічена при концентрації $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л [19].

В досліджах *in vitro* з препаратами клітин хлодитан в концентрації 15,6 мкмоль/л пригнічує активність глутатіон-S-трансферази в цитозолі надниркових залоз собак і морських свинок [15], а також зменшує рівень спонтанної пероксидації ліпідів в пост'ядерній фракції гомогенатів надниркових залоз собак і збільшує - в препаратах морської свинки [17]. У концентрації 156 мкмоль/л хлодитан різко збільшує швидкість і ступінь набухання мітохондрій надниркових залоз собак [9], а також гальмує в суспензії мітохондрій і мікросом кори надниркових залоз собак відновлення ферицианіду, прискорює - неотетразолію; при цьому відновлення цитохрому С у фракції мікросом гальмується, в фракції мітохондрій - прискорюється [5]. У концентрації 0,2 ммоль/л хлодитан пригнічує активність Na⁺, K⁺, Mg²⁺-АТФаз у гомогенаті та мітохондріальній фракції надниркових залоз собак [4].

Основним механізмом адренокортиколітичної дії хлодитану може бути зміна хімічного складу та функції (виразна зміна переносу електронів від НАДФ · Н - найважливішої функції мембран мітохондрій і мікросом кори надниркових залоз) мембран з їх наступною деструкцією [1, 10]. Крім цього, препарат викликає зміну активності деяких ферментів у адренокортикоцитах, що зумовлює гострий дефіцит НАДФ · Н і наступне гальмування стероїдогенезу [5, 10]. Нестача

відновленого НАДФ призводить та послаблення механізмів за пошкоджуючої дії перекисів пускатися також дія препаратів [12, 19]. Найбільш сильні зони кори надниркових залоз знають різних деструктивних тканиною [1].

Таким чином, результати здатний пригнічувати синтези надниркових залоз новонарод

I.P.Pasteur, N.D.Trunko

INFLUENCE OF CHLODITANE ON THE IN THE NEWBORN PIG ADRENAL CE

In experiments with a prima studied the influence of (adrenocortical function, on the adrenal cells, whose organ an as transplantation material for has been shown that incubat (final concentration in culture hours had a marked negative inclusion of ³H-thymidine and presence of a maximum C respectively, 16,9 and 46,0 Chloditane on the indices of been established only for conce 70 % from control. It has Chloditane action on the synt

V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гордиенко В.М. Реакция клеток кор Морфология. - 1984. - Вып. 9. - С.8
2. Комисаренко В.П., Турчин Г.С., Оши ліпідів та активності сукциндегідрогенірих залоз і нирок під впливом 1971. - N11. - С.1025-1028.
3. Комисаренко В.П. Применение ин чения гормонозависимых опухолей /
4. Комисаренко В.П., Микоша А.С., 1 рэтана (о,п'-ДДД) на АТФ-азы корь 24, N2. - С.85-89.
5. Комисаренко В.П., Микоша А.С., 4 митохондриях и микросомах коры и лорэтана // Укр. биохим. журн. -19

також надниркових залоз (7 міс) ну (на танов-мкг/мл явності нах і т вик-а та 3β-генезу

відновленого НАДФ призводить до зниження рівня SH груп у тканині та послаблення механізмів захисту клітин кори надниркових залоз від пошкоджуючої дії перекисів і супероксидних радикалів [10, 16]. Припускається також дія препарату на рецепцію АКТГ адренотропними гормонами [12, 19]. Найбільш сильно хлодитан уражує пучкову та сітчасту зони кори надниркових залоз [7], причому епітеліоцити цих зон зазнають різних деструктивних змін з наступним заміщенням сполучною тканиною [1].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що хлодитан здатний пригнічувати синтетичні процеси в первинній культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят.

I.P.Pasteur, N.D.Trunko

INFLUENCE OF CHLODITANE ON THE SYNTHETIC PROCESSES IN THE NEWBORN PIG ADRENAL CELLS

In experiments with a primary culture of adrenal cells, it has been studied the influence of Chloditane, as a specific inhibitor of adrenocortical function, on the synthetic processes in the newborn pig adrenal cells, whose organ and cell cultures are more and more used as transplantation material for the treatment of adrenal insufficiency. It has been shown that incubation of adrenocorticotocytes with Chloditane (final concentration in culture medium: 1 to 10000 ng/ml) during 24 hours had a marked negative dose-dependent effect on the indices of inclusion of ³H-thymidine and ³H-uridine into the nucleic acids. In the presence of a maximum Chloditane concentration, inclusion made, respectively, 16,9 and 46,0 % from control. A trustworthy effect of Chloditane on the indices of ³H-leucine inclusion (protein synthesis) has been established only for concentration 10 to 100 ng/ml and made near 70 % from control. It has been discussed a possible mechanism of Chloditane action on the synthetic processes in adrenal cells.

V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гордиенко В.М. Реакция клеток коры надпочечника на хлодитан после введения АКТГ // Морфология. - 1984. - Вып. 9. - С.85-88.
2. Комисаренко В.П., Турчин І.С., Онищенко Д.С., Прокопчук В.О. Цитохімічне дослідження ліпідів та активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази в клітинних культурах надниркових залоз і нирок під впливом хлодитану (о,п'-ДДД) // Доп. АН УРСР. Серія Б. - 1971. - N11. - С.1025-1028.
3. Комиссаренко В.П. Применение ингибиторов для регуляции эндокринных функций и лечения гормонозависимых опухолей // Врачеб. дело. - 1970. - N4. - С.13-18.
4. Комиссаренко В.П., Микоша А.С., Половко Е.П. Воздействие о,п'-дихлор-дифенилди-хлорэтана (о,п'-ДДД) на АТФ-азы коры надпочечников // Пробл. эндокринологии. - 1978. - 24, N2. - С.85-89.
5. Комиссаренко В.П., Микоша А.С., Челнакова И.С. Изменение электронного транспорта в митохондриях и микросомах коры надпочечников под влиянием о,п'-дихлордифенилди-хлорэтана // Укр. биохим. журн. - 1981. - 53, N 6. - С.75-77.

6. Комиссаренко И.В. Лечение болезни и синдрома Иценко-Кушинга хлоританом // Клин. медицина. - 1976. - 54, N 9. - С.122-127.
7. Комиссаренко И.В., Резников А.Г. Лечение хлоританом (о,п'-ДДД) болезни Иценко-Кушинга // Врачеб. дело. - 1970. - N 8. - С.107-112.
8. Кравченко В.И. Влияние о,п'-ДДД на образование кортикостероидов надпочечниковой тканью *in vitro* // Пробл. эндокринологии. - 1973. - 19, N5. - С.76-79.
9. Микоша А.С. Набухание митохондрий надпочечных желез при воздействии о,п'-дихлордифенилдихлорэтана *in vitro* // Докл. АН УССР. Серия Б. - 1984. - N 7. - С.68-70.
10. Микоша А.С. Основные процессы, обеспечивающие стероидогенез, и биохимические аспекты торможения функции коры надпочечных желез: Автореф. дис. ... док. мед. наук. - К., 1984. - 47 с.
11. Онищенко Д.С. Гистохимические изменения в клеточной культуре коры надпочечников собак при воздействии хлоритана. - В кн.: Актуальные вопросы экспериментальной и клинической эндокринологии: Тез. докл. III съезда эндокринологов Украинской ССР, 28-30 сент. 1982 г., Винница. - К., 1982. - С.66.
12. Резников А.Г. Биосинтез кортикостероидов в инкубируемых срезах надпочечников петухов после введения о,п'-ДДД // Физиология, биохимия и патология эндокринной системы. - 1972. - Вып. 2. - С.25-28.
13. Тронько М.Д., Кравченко В.И. Вплив о,п'-ДДД на зв'язувальну здатність транскортину у собак, шурів, морських свинок і курчат // Фізіол. журн. - 1971. - 17, N 2. - С.245-247.
14. Турчин І.С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. - 1996. - 1, N 2. - С.6-13.
15. Челнакова И.С., Микоша А.С., Тодор И.Н. Анализ влияния хлоритана на глутатион-S-трансферазу в надпочечниках и печени // Фармакология и токсикология. - 1985. - 48, N 6. - С.104-106.
16. Челнакова И.С., Тронько Н.Д., Микоша А.С. Вызываемые хлоританом изменения перекисного окисления липидов в надпочечниках собак и морских свинок // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1989. - 107, N 2. - С.171-174.
17. Челнакова И.С., Тронько Н.Д., Микоша А.С. Влияние аскорбата, NADPH и хлоритана на перекисное окисление липидов в надпочечниках собак и морских свинок *in vitro* // Вопр. мед. химии. - 1990. - 36, N 4. - С.32-34.
18. Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - 72, N 1-2. - P.248-254.
19. Hart M.M., Straw J.A. Effect of 1-(o-chlorophenyl)-1-(o-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in various preparations *in vitro* of dog adrenal cortex // Biochem. Pharmacol. - 1971. - 20, N 7. - P.1679-1688.
20. Komissarenko V.P., Reznikov A.G., Turchin I.S. Cytologic and functional changes in the adrenal cell culture from a human fetus under the action of o,p'-DDD. II. Study of corticosteroid production // Endocrinol. Experim. - 1971. - 5, N 4. - P.217-221.

Інститут ендокринології
та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України

Матеріал надійшов
до редакції 2.12.97

УДК 591.1: 591.481

О.О.Лук'янець, Г.В.Соткіс

Дослідження модулюючої у нейронах виноградного

Влияние серотонина (5-гидро
одинокных кальциевых канал
ронах виноградно улитки.
каналов, значение проводимо
ного типа клеток. Сделан
цевого макроток после п
уровне одиночных каналов, п
менения кинетики активиро
активированных каналов дан
бывания канала в открытом

Вступ

З'ясування молекулярних мех
іонних каналів збуджених ме
часної мембранології. Особли
них про структуру кальцієви
ширенням у мембрані багать
лику роль у спряженні різно
них процесів [3]. Кальцієвий
помітно змінювати концентра
активувати процеси м'язового
а також крізь ланцюг біохімі
мембрани. Самі кальцієві к
внутрішньоклітинної концент
системи кальцієвих каналів є
тичної мембрани нервових клі
7]. Розробка методу внутріш
кращому розумінню механізм
женість соматичної мембрани.
досліджувати властивості кал
представляє вивчення кальціє
диноких каналів за допомогою
«cell-attached» [1, 2, 12]. При
серотоніну (5-HT), який є пр
функціонування нервових кліт
для оцінки функціональних і
ких кальцієвих і калієвих ка