

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 612.453:612.43/45.018:546.32

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАЛІЮ НА ЕКСПРЕСІЮ мРНК ПРОТЕЇНУ StAR ТА ЦИТОХРОМУ P-450_{sc} В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНІЙ ТКАНИНІ ЛЮДИНИ

О. І. КОВЗУН, Н. М. КОСТЮЧЕНКО, В. М. ПУШКАРЬОВ,
О. С. ЛУКАШЕНЯ, О. С. МИКОША

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України», Київ;
e-mail: kovzun@newmail.ru

Досліджували вплив різних концентрацій калію на рівень мРНК протеїну-регулятора швидкої фази стероїдогенезу (StAR) та цитохрому P-450_{sc} у тканині кори надниркових залоз людини. Підвищення концентрації K⁺ у середовищі інкубації до 8,5 мМ призводить до збільшення в адренокортикоцитах кількості мРНК StAR та цитохрому P-450_{sc} на 70 та 76% відповідно порівняно з контролем.

Отже, посилення процесів синтезу мінералокортикоїдів у корі надниркових залоз у відповідь на дію іонів калію пов'язане з механізмами, що регулюють інтенсивність експресії протеїну-регулятора швидкої фази стероїдогенезу та цитохрому P-450_{sc} на рівні транскрипції.

Ключові слова: кора надниркових залоз, іони калію, StAR, цитохром P-450_{sc}.

Лімітуючим етапом біосинтезу стероїдних гормонів є перетворення холестеролу у прегненолон. Ця реакція – відщеплення ізокапронового альдегіду від холестеролу – здійснюється ензимним комплексом, в якому десмолаза функціонує разом з цитохромом P-450_{sc} [1, 2]. Дуже важливим процесом, що забезпечує десмолазну реакцію субстратом, є транспортування холестеролу із зовнішньої на внутрішню мембрану мітохондрій, де локалізується десмолаза. На сьогодні більшість дослідників як основний транспортер холестеролу розглядають протеїн StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) [1, 3, 4].

Посилення експресії та активація StAR може збільшувати швидкість відщеплення бічного ланцюга холестеролу через сАМР-залежні шляхи. Утворення сАМР і активація протеїнкінази А, які є важливими ланками контролю функції кори надниркових залоз, зростають в адренокортикальній тканині у разі підвищення концентрації калію [5]. Підвищення вмісту іонів калію у крові або інкубаційному середовищі сприяє синтезу мінералокортикоїду альдостерону; крім того, калій модулює ефекти інших регуляторів [2, 6] і впливає на систему Ca²⁺/

кальмодулінзалежної протеїнкінази [7, 8]. Разом з тим, внутрішньоклітинні процеси, що активуються в корі надниркових залоз під час підвищення концентрації калію, вивчено недостатньо. Метою роботи було визначення впливу різних концентрацій іонів калію на експресію мРНК StAR та цитохрому P-450_{sc} в умовно нормальній тканині надниркових залоз людини.

Матеріали і методи

У роботі використовували післяопераційну тканину кори надниркових залоз людини, яку одержували із хірургічного відділення Інституту ендокринології та обміну речовин. Проведення експериментів узгоджено з комітетом біоетики інституту. До зрізів із ділянок візуально незміненої тканини кори надниркових залоз (умовно нормальна тканина) вагою 20–40 мг додавали 1 мл розчину, що містив (в мМ): 130 NaCl; 1,27 MgSO₄; 2 CaCl₂; 10 Na₂HPO₄; 20 HEPES (pH 7,4) (Calbiochem, США), до якого додавали 2 мг БСА (Serva, Німеччина). Використовували солі кваліфікації осеч (Merck, Німеччина). Концентрацію KCl у пробах доводили до 3,5; 5,5; 8,5 мМ та інкубували протягом 1 год при 37 °С та за постійного струшування.

Інкубацію припиняли, переміщуючи проби на лід. Після охолодження середовище інкубації зливали і проводили екстракцію РНК. Для виділення РНК зрізи кори надниркових залоз гомогенізували в 1 мл TRIzol LS (Invitrogen, США), гомогенат струшували із хлороформом, після чого фази розділяли центрифугуванням (12 000 g, 4 °C, 15 хв). РНК осаджували з водної фази ізопропанолом, центрифугували (12 000 g, 4 °C, 15 хв), після чого осад збирали, двічі промивали 75%-им етанолом (7500 g, 4 °C, 5 хв), підсушували і розчиняли у воді без рибонуклеаз. Розчин РНК прогрівали при 60 °C протягом 10 хв. Концентрацію та чистоту РНК визначали на спектрофотометрі «Nanodrop» при довжині хвилі 260 і 280 нм.

Реакцію зворотної транскрипції проводили (ампліфікатор GeneTech фірми Stuart scientific, Італія) в реакційній суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, 5 мМ хлористого магнію, по 1 мМ всіх дНТФ, інгібітор РНК-ази (1 од./мкл), зворотну транскриптазу (2,5 од./мкл) (Sigma, США), суміш випадкових гексамерів (2,5 мкМ) та 1 мкг екстрагованої РНК. Інкубацію проводили за таких умов: 22 °C – 10 хв, 42 °C – 15 хв, 99 °C – 5 хв, 4 °C – 5 хв. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Techgene (Techne, Німеччина) у суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, 2 мМ хлористого магнію, по 1 мМ всіх дНТФ, 5 од./мкл Taq ДНК полімерази (Sigma, США), праймери до StAR (прямий 5'-TTCAAGCTGTGTGCTGGGAGCTCCTA-3'; зворотний 5'-TTACACTGGGCCTCAGAGGCAGGGCTGG-3') та P-450_{scc} (прямий 5'-CAGTGGCACTTG-TATGAGATG-3'; зворотний 5'-TGGTCATCTC-TAGCTCAGCG-3') (Sigma, США) по 0,2 мкМ, 5 мкл кДНК, одержаної внаслідок реакції зворотної транскрипції. Умови інкубації: (StAR) 94 °C – 45 сек, 55 °C – 75 сек, 72 °C – 15 сек, 4 °C (кількість циклів 27); (P-450_{scc}) 94 °C – 45 сек, 53 °C – 45 сек, 72 °C – 1,5 хв, 4 °C (кількість циклів 30). Продукти ПЛР аналізували в агарозному гелі (1,7%), який готували на буфері, що містив: 40 мМ трис-ацетат (рН 8,5), 2 мМ ЕДТА (ТАЕ-буфер). У гель додавали бромистий етидид до концентрації 1 мкг/мл. Проби готували, змішуючи розчин проби з розчином бромфенолового синього та сахарози (відповідно 0,025 та 45%) на ТАЕ-буфері. Загальний об'єм проби не перевищував 20 мкл. У роботі використовували маркери ДНК – 100–1000 пар основ (п.о.). Тривалість електрофорезу становила 1 год за напруги 100 мВ. Гелі фотографу-

вали у транслюмінаторі, сканували за допомогою програми «Scion Image» і порівнювали інтенсивність смуг ДНК, одержаної шляхом ампліфікації комплементарної ДНК.

Статистичну обробку одержаних даних проводили за непараметричним критерієм Вілкоксона–Манна–Уїтні.

Результати та обговорення

Навіть незначне підвищення концентрації іонів калію в інкубаційному середовищі спричиняє відчутні зміни у швидкості біосинтезу альдостерону в адренкортикальній тканині внаслідок особливої чутливості клітин клубочкової зони кори надниркових залоз до калію [2, 6]. Ці клітини реагують посиленням стероїдогенезу на зміну концентрації калію тільки в досить вузьких межах – від 5 до 9 мМ, які відображають реальні коливання вмісту іонів калію в живому організмі. Важливо підкреслити, що за низького рівня іонів калію в інкубаційному середовищі різко знижується швидкість біосинтезу альдостерону. Це вказує на можливість існування механізмів гальмування стероїдогенезу при концентраціях калію, нижчих від фізіологічного рівня (3–4 мМ).

Внесення до середовища інкубації високих концентрацій калію (8,5 мМ) зумовлює вірогідні зміни експресії мРНК StAR в адренкортикоцитах (рис. 1). У цих умовах спостерігається збільшення рівня експресії мРНК StAR на 70% порівняно з контролем (рис. 1, Б), а у разі додавання до середовища інкубації 5,5 мМ калію або 3,5 мМ калію – на 62 і 27% відповідно порівняно з контролем, проте ці зміни не є вірогідними (рис. 1, Б). Подібна закономірність спостерігається під час дослідження експресії мРНК цитохрому P-450_{scc}. Так, як видно на рис. 2, рівень експресії мРНК цитохрому P-450_{scc} за концентрації калію 5,5 мМ становить 127% (але цей показник є невірогідним). Збільшення концентрації калію до 8,5 мМ призводить до зростання експресії мРНК цитохрому P-450_{scc} на 76% щодо контролю (рис. 2, Б). При концентрації іонів калію в середовищі 3,5 мМ (нижча за фізіологічну) рівень експресії мРНК StAR та цитохрому P-450_{scc} не відрізняється від статистичного (рис. 1, 2). Таким чином, інкубація тканини в середовищі з 8,5 мМ концентрацією іонів калію спричинює збільшення в адренкортикоцитах людини експресії мРНК StAR та цитохрому P-450_{scc}. Ці дані збігаються з результатами дослідів на щурах *in vivo*, які одержували корм із вмістом 4% хлориду калію, і в яких спостерігали істотне збільшення рівня

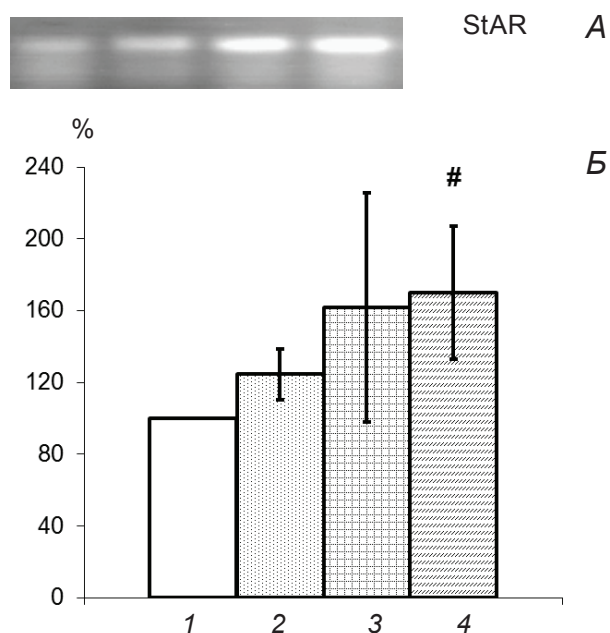


Рис. 1. Вплив різних концентрацій калію на рівень експресії мРНК StAR в умовно нормальній тканині кори надниркових залоз людини. А – електрофореграма продуктів ПЛР-реакції з використанням праймерів до StAR; Б – кількісна характеристика експресії мРНК. 1 – контроль, 2 – 3,5 мМ KCl, 3 – 5,5 мМ KCl, 4 – 8,5 мМ KCl. # – різниця з контролем є вірогідною ($P < 0,05$, $M \pm m$, $n = 4$)

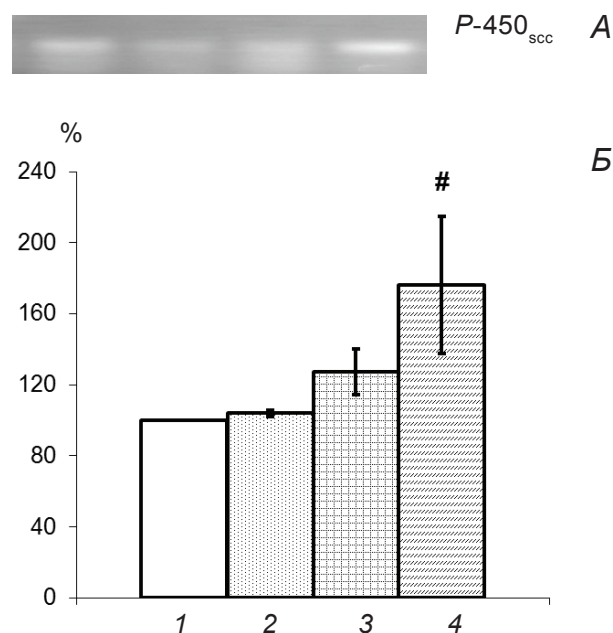


Рис. 2. Вплив різних концентрацій калію на рівень експресії мРНК цитохрому P-450_{scc} в умовно нормальній тканині кори надниркових залоз людини. А – електрофореграма продуктів ПЛР-реакції із використанням праймерів до цитохрому P-450_{scc}; Б – кількісна характеристика експресії мРНК. 1 – контроль, 2 – 3,5 мМ KCl, 3 – 5,5 мМ KCl, 4 – 8,5 мМ KCl. # – різниця з контролем є вірогідною ($P < 0,05$, $M \pm m$, $n = 3$)

мРНК StAR у клубочковій зоні надниркових залоз [9].

Як уже згадувалося, StAR відіграє значну роль у регулюванні транспортування холестеролу із зовнішніх до внутрішніх мітохондріальних мембран, де за допомогою цитохрому P-450_{scc} здійснюється реакція, що обмежує швидкість стероїдогенезу. У відповідь на стимуляцію тропними гормонами в цитозолі синтезується протеїн-попередник з молекулярною масою 37 кДа, сигнальна ділянка якого взаємодіє з рецепторами мітохондрій. Після відщеплення протеазами сигнальної ділянки утворюється зріла форма StAR (29–30 кДа), яка вже не забезпечує перенесення холестеролу, тому стимуляція стероїдогенезу потребує постійного утворення StAR із молекулярною масою 37 кДа [1, 10]. Головним чином він зосереджується в мітохондріях, але значна кількість незрілої форми цього протеїну міститься в цитозолі. Очевидно синтез і фос-

форильовання StAR відбувається в цитозолі, після чого протеїн мігрує до мітохондрій, де й здійснюється його процесинг.

Інші дані літератури свідчать про те, що іони калію посилювали фосфорильовання StAR за дії ангіотензину II [11]. Методом RT-PCR в реальному часі у фетальних стероїдогенних тканинах було ідентифіковано транскрипти мРНК StAR та альдостеронсинтази [12]. Вважається, що StAR може бути субстратом протеїнкінази C, активатори якої посилювали секрецію альдостерону у присутності іонів калію [11, 13]. Раніше нами показано збільшення активності ПКС внаслідок дії іонів калію в умовах *in vitro* [5].

Одержані дані дозволяють вважати, що посилення продукції мінералокортикоїдів в умовах дії іонів калію забезпечується за рахунок транспортування холестеролу через мітохондріальну мембрану та подальшої конверсії його у прегненолон за участю StAR і цитохрому P-450_{scc}.

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ
КОНЦЕНТРАЦИЙ КАЛИЯ
НА ЭКСПРЕССИЮ мРНК
StAR И ЦИТОХРОМА P-450_{sc}
В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ
ЧЕЛОВЕКА**

*Е. И. Ковзун, Н. Н. Костюченко,
В. М. Пушкарев, О. С. Лукашениа,
А. С. Микоша*

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ
им. В. П. Комиссаренко АМН Украины», Киев;
e-mail: kovzun@newmail.ru

Исследовали влияние различных концентраций калия на уровень мРНК протеина-регулятора быстрой фазы стероидогенеза (StAR) и цитохрома P-450_{sc} в тканях коры надпочечников человека. Повышение концентрации K⁺ в среде инкубации до 8,5 мМ приводит к увеличению в аденокортикоцитах количества мРНК StAR и цитохрома P-450_{sc} соответственно на 70 и 76% по сравнению с контролем.

Таким образом, усиление процессов синтеза минералокортикоидов в коре надпочечников в ответ на действие ионов калия связано с механизмами, регулируемыми на уровне транскрипции интенсивность экспрессии протеина-регулятора быстрой фазы стероидогенеза и цитохрома P-450_{sc}.

Ключевые слова: кора надпочечников, ионы калия, StAR, цитохром P-450_{sc}.

**THE EFFECT OF POTASSIUM
DIFFERENT CONCENTRATIONS
ON mRNA EXPRESSION OF PROTEIN
StAR AND CYTOCHROME P-450_{sc}
IN HUMAN ADRENOCORTICAL TISSUE**

*O. I. Kovzun, N. N. Kostuchenko,
V. M. Pushkariov, O. S. Lukashenia,
A. S. Mikosha*

State Institution V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kovzun@newmail.ru

S u m m a r y

The effect of different potassium concentrations on changes in steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P-450_{sc} in human adrenal cortex tissue was studied. A rise in K⁺

concentration in incubation medium to 8.5 mM caused an increase in StAR and cytochrome P-450_{sc} mRNA level in adrenocorticoocytes by 70 and 76%, respectively, compared with control.

Thus, potassium ions caused an enhancement of mineralocorticoid synthesis in the adrenal cortex, which is associated with mechanisms that regulate the intensity of expression of StAR and cytochrome P-450_{sc} on a transcriptional level.

Key words: adrenal cortex, potassium ions, StAR, cytochrome P-450_{sc}.

1. *Stocco D. M.* // J. Endocrinol. — 2000. — **164**. — P. 247–253.
2. *Spat A.* // Mol. Cell. Endocrinol. — 2004. — **217**, N 1–2. — P. 23–26.
3. *Stocco D. M., Clark B. J.* // Endocr. Rev. — 1996. — **17**. — P. 221–244.
4. *Christenson L. K., Strauss J. F.* // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — **1529**. — P. 175–187.
5. *Пушкарьов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д. та ін.* // Укр. біохім. журн. — 2005. — **77**, № 1. — С. 65–71.
6. *Тронько М. Д., Ковзун О. І., Пушкарьов В. М.* Механізми регуляції стероїдогенезу в корі надниркових залоз. — К.: Центр навчальної літератури, 2006. — 304 с.
7. *Ganguly A., Chiou S., Fineberg N. S., Davis J. S.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1992. — **182**. — P. 254–261.
8. *Nogueira E. F., Gerry D., Mantero F. et al.* // Clin. Endocrinol. (Oxf). — 2010. — **73**, N 1. — P. 22–29.
9. *Peters B., Teubner P., Clausmeyer S. et al.* // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. — 2007. — **292**, N 1. — E 16–23.
10. *Miller W. L.* // Endocr. Dev. — 2011. — **20**. — P. 1–19.
11. *Betancourt-Calle S., Calle R. A., Isales C. M. et al.* // Mol. Cell. Endocrinol. — 2001. — **173**, N 1–2. — P. 87–94.
12. *Pezzi V., Mathis J. M., Rainey W. E., Carr B. R.* // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. — 2003. — **87**. — P. 181–189.
13. *Alvarez C., Lorenzo C., Santana F., Borges R.* // Biochem. Pharmacol. — 1997. — **53**, N 3. — P. 317–325.

Отримано 21.04.2011