

О.М. Перминова, В.О. Ткачев, В.В. Сеньюков, О.Т. Кудаева, Н.Н. Вольский

СУПРЕССИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА СУЛЬФАТА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO* НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ МЫШИ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Изучено влияние дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС) на продукцию активированных кислородных метаболитов клетками иммунной системы мыши *in vivo* и *in vitro*. Обнаружено, что через 6 часов после подкожного введения ДГЭА сульфата (0,75 мг/мышь) скорость продукции супероксидного радикала в селезенке достоверно снижается на 23% по сравнению с контрольной группой. Показано также, что ДГЭА сульфат дозозависимо (в концентрациях от 50 мкМ до 200 мкМ) подавляет продукцию H_2O_2 в тимоцитах мыши *in vitro* (при концентрации гормона, равной 200 мкМ, этот показатель снижается на 58%). Влияние ДГЭА на внутриклеточный уровень перекисей может объяснять его защитный эффект при глюкокортикоид-зависимом апоптозе тимоцитов.

Ключевые слова: тимоциты, клетки селезенки, дегидроэпиандростерон, активированные кислородные метаболиты

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) — гормон, продуцируемый сетчатой зоной коры надпочечников в количествах, превышающих продукцию всех прочих стероидных гормонов. Его концентрация в крови, где он присутствует в основном в виде своей транспортной формы — ДГЭА сульфата, выше концентрации гидрокортизона более чем на порядок, что предполагает существенную роль ДГЭА в гормональном балансе организма. В то же время метаболические и клеточные эффекты ДГЭА, его тканевые мишени и механизмы его действия относительно мало изучены по сравнению с другими стероидными гормонами. В последние годы основное внимание исследователей было привлечено к эффектам ДГЭА в нервной и иммунной системах. Особенный интерес вызвали работы, в которых было показано резкое и закономерное снижение продукции ДГЭА у пожилых людей, происходящее на фоне повышающегося с возрастом уровня глюкокортикоидов [13]. С дисбалансом этих гормонов и с нарушением нормального (то есть присущего более молодому возрасту) соотношения «глюкокортикоиды/ДГЭА» связывают возникновение в старости характерных изменений некоторых физиологических функций, в частности возрастную супрессию клеточных иммунных реакций. Эти клинические наблюдения совпадают с данными, полученными в экспериментах на животных и говорящими о существенном влиянии этих гормонов на Th1/Th2-поляризацию [10]. Попытки, в некоторых

случаях довольно успешные, корректировать нежелательные возрастные изменения с помощью приема больших доз ДГЭА привели к тому, что этот гормон стал рекламироваться в качестве «источника молодости», несмотря на еще слабую научную обоснованность такой характеристики его свойств. В связи с этим представляется важным широкое экспериментальное изучение физиологических функций ДГЭА, в том числе его влияния на иммунные реакции. Во многих случаях действие этого гормона на функциональные системы и метаболические процессы противоположно эффектам глюкокортикоидов, механизмы действия которых изучены гораздо лучше, поэтому исследование антиглюкокортикоидных эффектов ДГЭА может оказаться перспективным путем для понимания места ДГЭА в эндокринной регуляции иммунитета.

Клеточные и молекулярные механизмы, с помощью которых осуществляется антиглюкокортикоидное действие ДГЭА, еще не выяснены, однако предполагается, что этот гормон влияет на клетки экстрагеномным путем, поскольку специфические цитоплазматические рецепторы к ДГЭА, характерные для всех других изученных стероидных гормонов, в клетках не обнаруживаются. Одним из главных примеров функционального антагонизма между ДГЭА и глюкокортикоидами является их действие на клетки тимуса, впервые обнаруженное еще в 70-е годы. Показано, что гибель тимоцитов и резкое уменьшение веса

тимуса, наблюдающиеся после введения экспериментальным животным больших доз глюкокортикоидных гормонов, отсутствуют у животных, которым предварительно вводили ДГЭА [3]. С другой стороны, нами было установлено, что глюкокортикоиды, как *in vivo*, так и *in vitro*, стимулируют продукцию активированных кислородных метаболитов (АКМ) клетками иммунной системы [2] и что индуцированный этими гормонами апоптоз тимоцитов опосредуется продукцией перекиси водорода [14]. Исходя из этих данных, мы предположили, что антиглюкокортикоидные эффекты ДГЭА опосредуются его супрессирующим влиянием на продукцию АКМ клетками.

Целью настоящей работы было исследование влияния ДГЭА сульфата на продукцию АКМ иммунокомпетентными клетками в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Методика

Опыты проводились на мышах-самках (DBA x C57Bl)F1 и мышах-самцах (CBA x C57Bl)F1. Животных получали из вивария СО РАМН, содержали на стандартной лабораторной диете и использовали в возрасте 3-5 месяцев. Содержание животных до и в период проведения экспериментов осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). В опытах *in vivo* животным вводили ДГЭА сульфат («Aldrich») п/к в дозе 0,75 мг/мышь. Животным в контрольных группах п/к вводили растворитель (среду RPMI-1640). Через 6 часов после введения гормона мышей забивали и оценивали уровень продукции супероксидного радикала (O_2^-) фагоцитирующими клетками селезенки методом, основанным на восстановлении нитросинего тетразолия [2]. Для этого клетки селезенки инкубировали в течение 45 мин при 37 °С в среде, содержащей 20 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), 10 мМ глюкозы, 0,2% NaCl, 0,4 мг/мл НСТ («Calbiochem»). В качестве стимулирующего воздействия в инкубационную среду добавляли 7,5 мкг продигозана. Образовавшийся формазан осаждали 0,5 н HCl и растворяли в 450 мкл диметилсульфоксида, после чего измеряли оптическую плотность на мультискане «Titertek» при 570 нм. Результаты выражали в условных единицах и в процентах от соответствующего контроля.

Скорость продукции АКМ в клетках тимуса оценивали по стационарному уровню перекиси водорода в тимоцитах, инкубируемых в среде с небольшим содержанием (5%) фетальной телячьей сыворотки. Внутриклеточный уровень H_2O_2 измеряли стандартным методом с помощью прочной цитометрии, используя 2'7'-дихлорфлу-

оресцин-диацетат (DCFH), окисляющийся под действием H_2O_2 до интенсивно флуоресцирующего продукта. ДГЭА сульфат добавляли к среде инкубации тимоцитов в различных концентрациях за 10 мин до внесения в пробы 2'7'-дихлорфлуоресцин-диацетата («Sigma»). Аналогичным образом в пробы добавляли $Cu(Lys)_2$ — хелат меди с супероксиддисмутазной активностью (СОД-миметик), полученный по методу [11].

При статистической обработке данных рассчитывали среднюю арифметическую (М) и ее стандартную ошибку (m). Достоверность различий сравниваемых параметров оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты

Введение ДГЭА сульфата *in vivo* приводило, как показано на рис. 1, к достоверному снижению скорости образования O_2^- в суспензии спленоцитов, где основным источником АКМ является НАД(Ф)Н-оксидазный комплекс клеток-фагоцитов. Аналогичным образом изменялась после введения гормона и продукция O_2^- , стимулированная добавлением в клеточную суспензию активатора НАД(Ф)Н-оксидазы — продигозана (снижение стимулированной продукции O_2^- до 74% от соответствующего контроля).

Антиоксидантные свойства ДГЭА описаны впервые более двадцати лет назад [15], однако имеющиеся на сегодняшний день данные по этому поводу разрознены и противоречивы. Так, в экспериментах *in vitro* показано ингибирующее влияние ДГЭА на продукцию O_2^- перитонеальными макрофагами крысы [6], альвеолярными макрофагами кроликов [4] и альвеолярными макрофагами больных асбестозом [9], при этом эффект

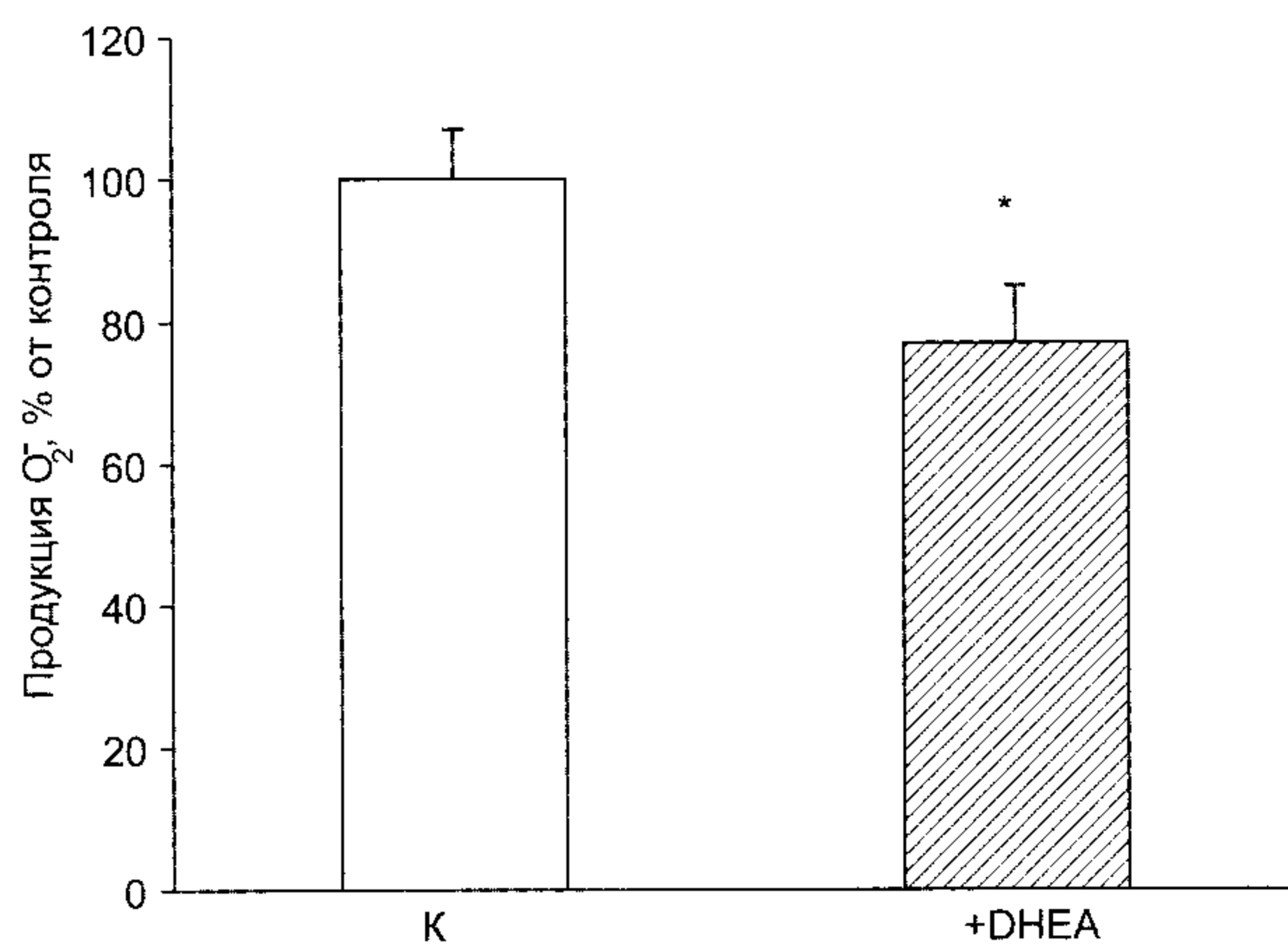


Рис. 1. Влияние дегидроэпиандростерона *in vivo* на продукцию супероксидного радикала клетками селезенки мышей (DBA x C57Bl)F1.

К — контроль; + DHEA — продукция O_2^- через 6 ч после п/к введения ДГЭА сульфата;

* достоверное отличие от контроля — $p < 0,05$ ($n = 15$)

гормона объяснялся его известной способностью супрессировать активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ) — ключевого фермента пентозного цикла, снабжающего НАД(Ф)Н-оксидазу восстановительными эквивалентами. В то же время в других исследованиях [5, 6] его антиоксидантные эффекты, в частности супрессия такой O_2^- -зависимой клеточной функции как пролиферация лимфоцитов, не связываются с его влиянием на активность Г6ФДГ, и ДГЭА в той же мере подавляет митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов у лиц с генетическим дефектом Г6ФДГ, как и у здоровых индивидов [5]. Кроме того, в литературе сообщается о стимуляции ДГЭА образования свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов в печени крыс после кормления их пищей, содержащей этот гормон в дозе 500 мг/кг [12], и о снижении продукции O_2^- нейтрофилами пожилых людей, у которых было увеличено соотношение «гидрокортизон/ДГЭА» [8]. Полученные нами в экспериментах *in vivo* результаты однозначно свидетельствуют, что в клетках иммунной системы ДГЭА сульфат подавляет базальную и стимулированную продукцию АКМ, и следовательно, его влияние на функциональные свойства лимфоцитов может объясняться этим эффектом.

По нашему предположению, этот механизм может лежать в основе антиглюкокортикоидных эффектов ДГЭА, в частности, его супрессирующего влияния на апоптоз лимфоцитов, вызванный глюкокортикоидами [7]. Проверка этого предположения была проведена на суспензии тимоцитов мыши *in vitro* — то есть в той экспериментальной системе, в которой нами было ранее показано, что

дексаметазониндуцированный апоптоз тимоцитов опосредуется увеличенной внутриклеточной продукцией H_2O_2 [14]. Апоптогенный эффект H_2O_2 хорошо известен [1], и его значимость в данном случае подтверждается тем, что каталаза, снижающая концентрацию H_2O_2 , и дифенилениодониум — ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы, блокирующий стимуляцию дексаметазоном продукции АКМ — уменьшают интенсивность апоптоза [14].

Измеряя стационарный уровень H_2O_2 в лимфоцитах, отражающий скорость продукции этого метаболита клетками тимуса, мы установили, что добавление к суспензии клеток СОД-миметика $Cu(Lys)_2$ (дисмутирующего супероксидный радикал в H_2O_2) вдвое увеличивает стационарный уровень перекисей в тимоцитах (Рис. 2). Этот факт можно рассматривать как подтверждение того, что основным источником перекисей в исследованных экспериментальных условиях являются супероксидгенерирующие ферментные системы клеток, такие, как НАД(Ф)Н-оксидаза.

ДГЭА сульфат в концентрациях от 50 мкМ до 200 мкМ дозозависимо ингибировал продукцию H_2O_2 в клетках тимуса. Как видно на рис. 3, при концентрации ДГЭА сульфата 200 мкМ уровень перекисей снижается более чем в два раза (на 58%), отражая соответствующее уменьшение скорости образования H_2O_2 . Поскольку в использованной нами экспериментальной системе снижение концентрации H_2O_2 приводит к уменьшению интенсивности апоптоза, можно с большой уверенностью утверждать, что давно описанный супрессирующий эффект ДГЭА на глюкокортикоидиндуцированный лизис тимоцитов хорошо объясняется антиоксидантными свойствами этого гормона, проявляющимися, как показывают

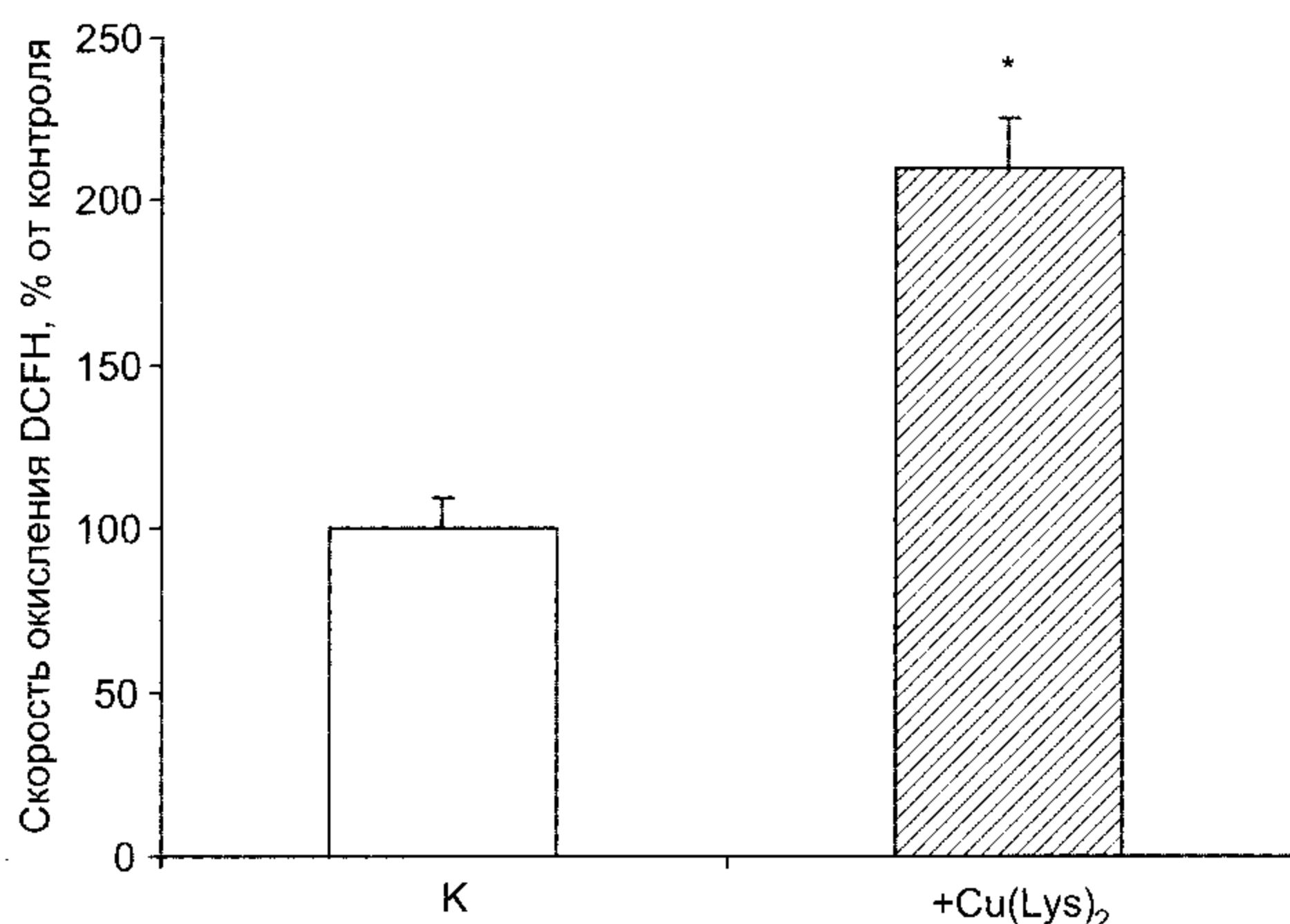


Рис. 2. Влияние СОД-миметика $Cu(Lys)_2$ на уровень H_2O_2 в суспензии тимоцитов мышей (СВА x C57Bl)F1.

К — контроль (стационарный уровень H_2O_2 в отсутствие $Cu(Lys)_2$ в среде инкубации);
 + $Cu(Lys)_2$ — уровень H_2O_2 в присутствии 150 мкМ $Cu(Lys)_2$ в среде инкубации;
 * достоверное отличие от контроля — $p < 0,05$ ($n = 4$).

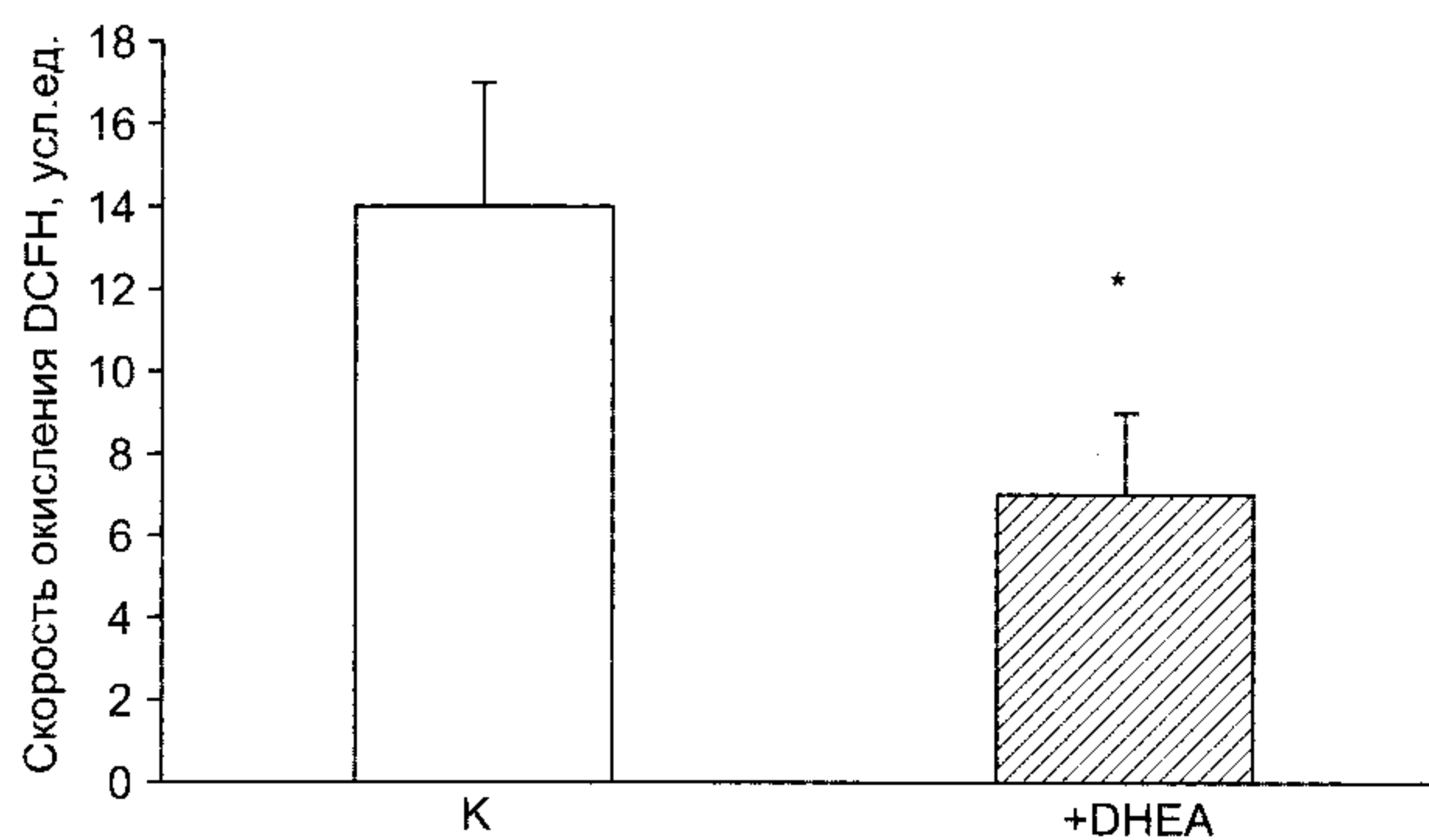


Рис. 3. Влияние дегидроэпиандростерона *in vitro* на уровень H_2O_2 в тимоцитах мышей (СВА x C57Bl)F1.

К — контроль (стационарный уровень H_2O_2 в отсутствие ДГЭА сульфата в среде инкубации);
 + DHEA — стационарный уровень H_2O_2 в присутствии 200 мкМ ДГЭА сульфата в среде инкубации;
 * достоверное отличие от контроля — $p < 0,05$ ($n = 7$).

полученные нами данные, в снижении продукции АКМ клетками тимуса мышей.

Заключение

Таким образом, основываясь на результатах проведенного исследования, можно сделать вывод о том, что одним из возможных механизмов действия ДГЭА сульфата на иммунную систему является его ингибирующее влияние на внутриклеточную продукцию АКМ, объясняющее его антиглюкокортикоидные эффекты, такие, как подавление глюкокортикоидиндуцированного апоптоза тимоцитов и, вероятно, его влияние на Th1/Th2-баланс в организме.

DEHYDROEPIANDROSTERONE SULFATE SUPPRESSIVE EFFECT IN VIVO AND IN VITRO ON THE REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION BY MOUSE IMMUNOCOMPETENT CELLS

O.M. Perminova, V.K. Tkachev, V.V. Senjukov, O.T. Kudaeva, N.N. Volsky

Effect of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA) on the reactive oxygen species production by mouse immune system cells was investigated *in vivo* and *in vitro*. It was found that DHEA subcutaneous injection (0,75 mg/mouse) led to a statistically significant decrease of superoxide anion generation rate by 23% (vs control group) in spleen within 6 hours after injection. It was also revealed that DHEA (at concentrations from 50 μ M to 200 μ M) inhibited the hydrogen peroxide production in murine thymocytes *in vitro* in dose-dependent manner. Addition of DHEA (200 μ M) to thymocyte incubation medium results in a decrease of the H₂O₂ production rate (by 58% vs control). Influence of DHEA on the intracellular peroxide level provides an explanation of its protective effect at the glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis.

Литература

1. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, Н.Н. Вольский, В.А. Козлов // Успехи совр. биол. — 1999. — Т. 119. — № 5. — С. 440-450.
2. Вольский Н.Н. Влияние гидрокортизона на продукцию супероксидного радикала фагоцитирующими клетками селезенки / Н.Н. Вольский, В.А. Козлов, В.П. Лозовой // Бюлл. эксп. биол. мед. — 1987. — Т. 103. — № 6. — С. 694-696.
3. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte pro-

liferation / K.L. Blauer, M. Poth, W.M. Rogers, E.W. Bernton // Endocrinology. — 1991. — Vol. 129. — № 6. — P. 3174-3179.

4. Heffner J.E. Inhibition of rabbit lung glucose-6-phosphate dehydrogenase by dehydroepiandrosterone augments oxidant injury / J.E. Heffner, M. Milam // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 2. — № 3. — P. 257-261.

5. Influence of dehydroepiandrosterone on G-6-PD activity and ³H-thymidine uptake of human lymphocytes *in vitro* / M.G. Ennas, S. Laconi, S. Dessi et al. // Toxicol. Pathol. — 1987. — Vol. 15. — № 2. — P. 241-244.

6. Mohan P.F. Inhibition of macrophage superoxide generation by Dehydroepiandrosterone / P.F. Mohan, M.S. Jacobson // Am. J. Med. Sci. — 1993. — Vol. 306. — № 1. — P. 10-15.

7. Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone / M. May, E. Holmes, W.M. Rogers, M. Poth // Life Sci. — 1990. — Vol. 46. — № 22. — P. 1627-1631.

8. Raised cortisol: DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity / S.K. Butcher, V. Killampalli, D. Lascelles et al. // Aging Cell. — 2005. — Vol. 4. — № 6. — P. 319-324.

9. Rom W.N. Dehydroepiandrosterone inhibits the spontaneous release of superoxide radical by alveolar macrophages *in vitro* in asbestosis / W.N. Rom, T. Harkin // Environ. Res. — 1991. — Vol. 55. — № 2. — P. 145-156.

10. Rook G.A. Hormones, peripherally activated pro-hormones and regulation of the Th1/Th2 balance / G.A. Rook, R. Hernandez-Pando, S.L. Lightman // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15. — № 7. — P. 301-303.

11. Stevens C.M. New syntheses of α -amino- ϵ -guanidino-n-caproic acid (homoarginine) and its possible conversion *in vivo* into lysine / C.M. Stevens, J.A. Bush // Biol. Chem. — 1950. — Vol. 183. — № 1. — P. 139-147.

12. Swierczynski J. Vitamin E prevents induction of carbonyl group formation in microsomal protein by dehydroepiandrosterone / J. Swierczynski, D. Mayer // Nutr. Cancer. — 1998. — Vol. 32. — № 2. — P. 101-106.

13. Valenti G. Adrenopause: an imbalance between dehydroepiandrosterone (DHEA) and cortisol secretion / G. Valenti // J. Endocrinol. Invest. — 2002. — Vol. 25. — 10 Suppl. — P. 29-35.

14. Volsky N.N. Membrane NADPH oxidase and hormonal regulation of the immunocompetent cell functional activity / N.N. Volsky, V.O. Persijanova, V.A. Kozlov // Russian J. Immunol. — 2001. — Vol. 6. — № 2. — P. 147-156.

15. Whitcomb J.M. Dehydroepiandrosterone and 16 α -Br-epiandrosterone inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulation of superoxide radical production by human polymorphonuclear leukocytes / J.M. Whitcomb, A.G. Schwartz // Carcinogenesis. — 1985. — Vol. 6. — № 3. — P. 333-335.