

## РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНИТЕТА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 615.357:577.175.53].015.4.076.9

*Н. Н. Вольский, О. Т. Кудаева, О. М. Перминова, В. О. Ткачев, Е. В. Гойман,  
В. В. Сенюков, Т. А. Обут, В. А. Козлов*

### АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА СУЛЬФАТА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ТН1/ТН2-БАЛАНС В ОПЫТАХ IN VIVO

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Установлено, что через 6 ч после подкожного введения мышам дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС) в дозе 0,75 мг/мышь скорость продукции супероксидного радикала в селезенке достоверно снижается на 23% по сравнению с контрольной группой. В суспензии тимоцитов мыши *in vitro* ДГЭАС дозозависимо подавляет продукцию  $H_2O_2$  (при концентрации гормона, равной 200 мкМ, этот показатель снижается на 58%). Обнаружено также, что введение ДГЭАС мышам (0,75 мг/мышь) в ходе индукции хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) замедляет развитие Th2-зависимых процессов, ведущих к формированию гломерулонефрита, и более чем в 2 раза снижает частоту развития Th2-зависимого варианта РТПХ. Сделан вывод, что антиглюкокортикоидные эффекты ДГЭА, в частности сдвиг Th1/Th2-баланса в целом организме, могут опосредоваться его антиоксидантными свойствами.

It is found that dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) subcutaneous injection (0,75 mg/mouse) leads to statistically significant decrease of superoxide anion rate (by 23% in comparison with control group) in spleen within 6 hours after injecting. DHEAS inhibits  $H_2O_2$  production at murine thymocyte suspension *in vitro* by dose-dependent manner (this parameter decreases by 58% at 200  $\mu$ M hormone concentration). It was also revealed that DHEAS injection (0,75 mg/mouse) had delayed Th2-dependent process development leading to glomerulonephritis formation during induction of chronic graft versus host disease (cGvHDs) and it had decreased the frequency of Th2-dependent cGvHDs development more than in 2 times. It is supposed that the antigluco-corticoid effects (such as Th1/Th2-balance change in whole organism) can be mediated by antioxidative properties.

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) — гормон, продуцируемый сетчатой зоной коры надпочечников человека в количествах, превышающих продукцию всех прочих стероидных гормонов; его концентрация в крови, где он присутствует в основном в виде дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС), на порядок выше концентрации гидрокортизона, что предполагает существенную роль ДГЭА в гормональном балансе организма [5]. В то же время метаболические и клеточные эффекты ДГЭА, его тканевые мишени и механизмы действия относительно мало изучены по сравнению с другими стероидными гормонами. В последние годы основное внимание исследователей привлекали эффекты ДГЭА в нервной и иммунной системах [7]. Особый интерес вызвали работы, в которых было показано резкое и закономерное снижение продукции ДГЭА у пожилых людей, происходящее на фоне повышающегося с возрастом уровня глюкокортикоидов [19, 26]. С нарушением соотношения глюкокортикоиды/ДГЭА связывают изменения некоторых физио-

логических функций, в частности, возрастную супрессию клеточных иммунных реакций [14, 16, 28]. Эти клинические наблюдения совпадают с данными, полученными в экспериментах на животных и свидетельствующими о существенном влиянии ДГЭА на Th1/Th2-поляризацию [21, 22]. Попытки, в некоторых случаях довольно успешные, корректировать нежелательные возрастные изменения с помощью приема больших доз ДГЭА привели к тому, что этот гормон без достаточного научного обоснования стал рекламироваться в качестве "источника молодости". 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 физиологические системы и метаболические процессы противоположно эффектам глюкокортикоидов, механизмы действия которых изучены гораздо лучше, и поэтому исследование антиглюкокортикоидных эффектов ДГЭА может оказаться пер-

спективным путем для понимания места ДГЭА в эндокринной регуляции иммунитета. Предполагается, что этот гормон влияет на клетки экстрагеномным путем [7], поскольку специфические цитоплазматические рецепторы к ДГЭА, характерные для большинства стероидных гормонов, в клетках не обнаруживаются [18]. Одним из главных примеров функционального антагонизма между ДГЭА и глюкокортикоидами является их действие на клетки тимуса, впервые обнаруженное еще в 1970-е годы. Показано, что гибель тимоцитов и резкое уменьшение массы тимуса, наблюдающиеся после введения больших доз глюкокортикоидов, отсутствуют у животных, которым предварительно вводили ДГЭА [9, 15]. В то же время ранее нами было установлено, что глюкокортикоиды как *in vivo*, так и *in vitro* стимулируют продукцию активных кислородных метаболитов (АКМ) клетками иммунной системы [1] и что индуцированный этими гормонами апоптоз тимоцитов опосредуется продукцией перекиси водорода [27]. Исходя из этих данных, мы предположили, что антиглюкокортикоидные эффекты ДГЭА опосредуются его супрессирующим влиянием на продукцию АКМ клетками.

Целью настоящей работы было получение экспериментальных свидетельств в пользу данного предположения.

**Материалы и методы.** В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов (C57BL/6xDBA/2) $F_1$  (BDF $_1$ ) в возрасте 2 мес, полученных из питомника "Рассвет" (г. Томск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Оценку Th1/Th2-баланса в целостном организме проводили на модели хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), развивающейся в двух клинических вариантах: Th1-зависимом (без нефрита) и Th2-зависимом (с развитием иммунокомплексного люпус-подобного гломерулонефрита) [6]. Хроническую РТПХ вызывали двукратным введением мышам-самкам BDF $_1$  лимфоидных клеток мышей-самок DBA/2. Смесь клеток селезенки и лимфатических узлов вводили реципиентам в количестве  $65 \cdot 10^6$  внутривенно; через 6 дней эту операцию повторяли. Отсчет времени вели со дня первого переноса клеток. О развитии у реципиентов гломерулонефрита (Th2-зависимый вариант РТПХ) судили по появлению у них через 2—3 мес стойкой выраженной протеинурии, которая жестко сопряжена с морфологическими критериями поражения почек [4]. Концентрацию белка в моче измеряли колориметрически с красителем Кумасси голубой [10].

Части животных, у которых индуцировалась хроническая РТПХ, вводили ДГЭАС ("Aldrich") подкожно в дозе 0,75 мг на мыш, либо двукратно (за 1 сут перед первым и вторым переносами клеток), либо 4-кратно — два добавочных введения гормона на 3-и сутки после первого и второго переносов клеток.

Уровень продукции супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) фагоцитирующими клетками селезенки мышей-самок BDF $_1$  оценивали по скорости восстановления нитросинего тетразолия [1] через 6 ч после подкожного введения ДГЭАС в дозе 0,75 мг на мыш. В качестве стимулятора в инкубационную среду добавляли 7,5 мкг продигозана. Результаты выражали в условных единицах и в процентах от соответствующего контроля.

Скорость продукции АКМ в клетках тимуса мышей-самок BDF $_1$  оценивали по стационарному уровню перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в тимоцитах, инкубируемых в среде с небольшим содержанием (5%) фетальной телячьей сыворотки. Внутриклеточный уровень  $H_2O_2$  измеряли стандартным методом с помощью точной цитометрии, используя 2'-дихлорфлюоресцина диацетат (DCFH) [8]. ДГЭАС добавляли к среде инкубации тимоцитов в различных концентрациях за 10 мин до внесения в пробы DCFH. Аналогичным образом в пробы добавляли  $Cu(Lys)_2$  — хелат меди с супероксиддисмутазной активностью (СОД-миметик), полученный по методу [23].

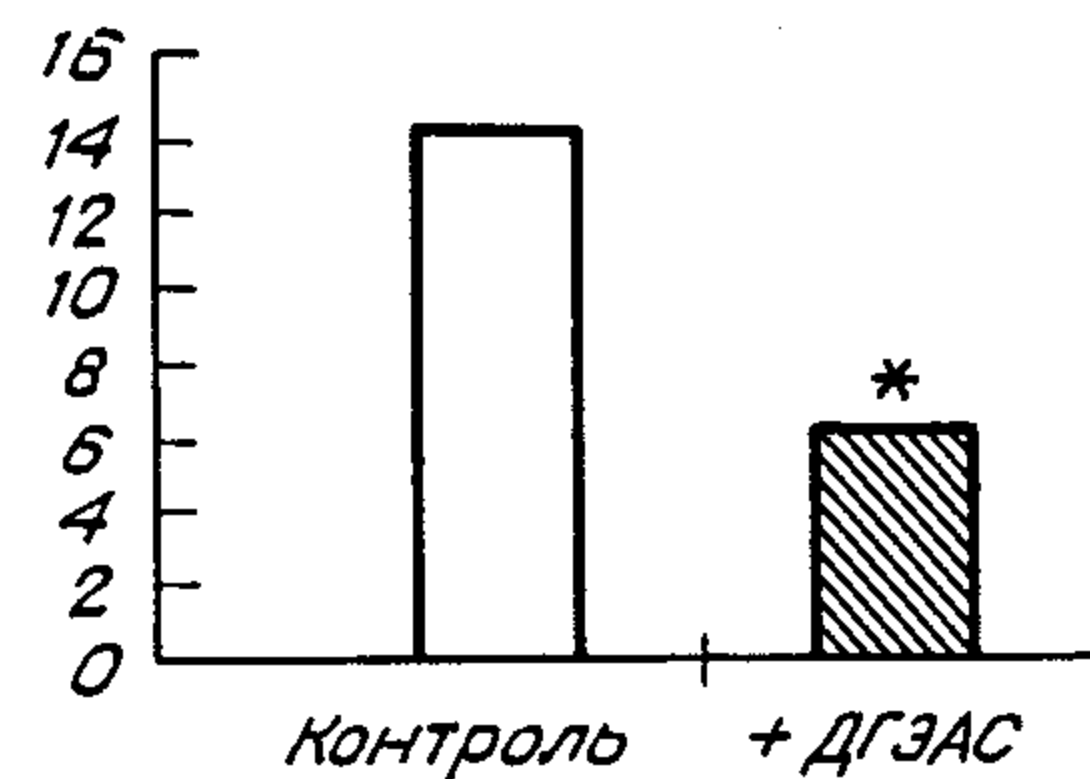


Рис. 1. Влияние ДГЭАС на стационарную концентрацию  $H_2O_2$  в тимоцитах мышей BDF $_1$ .

По оси ординат — скорость окисления DCFH (в усл. ед.). К — контроль (скорость окисления DCFH в отсутствие ДГЭАС в среде инкубации); + ДГЭАС — скорость окисления DCFH в присутствии 200 мкМ ДГЭАС в среде инкубации. Звездочка — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$  ( $n = 7$ ).

При статистической обработке данных рассчитывали среднюю арифметическую (M). Достоверность различий сравниваемых параметров оценивали с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни.

**Результаты и обсуждение.** По нашему предположению, супрессия АКМ-продуцирующих систем может лежать в основе антиглюкокортикоидных эффектов ДГЭА, в частности, его супрессирующего влияния на апоптоз лимфоцитов, вызванный глюкокортикоидами [15]. Проверка этого предположения была проведена на суспензии тимоцитов мыши *in vitro*, т. е. в той экспериментальной системе, в которой нами было ранее показано, что дексаметазониндуцированный апоптоз тимоцитов опосредуется увеличенной внутриклеточной продукцией  $H_2O_2$  [27]. Апоптогенный эффект  $H_2O_2$  хорошо известен [2, 12], и его значимость в данном случае подтверждается тем, что каталаза, снижающая концентрацию  $H_2O_2$ , и дифенилениодоний — ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы, блокирующий стимуляцию продукции АКМ дексаметазоном, уменьшают интенсивность апоптоза [27].

Измеряя стационарный уровень  $H_2O_2$  в лимфоцитах, отражающий скорость продукции этого метаболита клетками тимуса, мы установили, что добавление к суспензии клеток 150 мкМ  $Cu(Lys)_2$  (дисмутирующего супероксидный радикал в  $H_2O_2$ ) вдвое увеличивает стационарный уровень перекисей в тимоцитах. Этот факт можно рассматривать как подтверждение того, что основным источником перекисей в исследованных экспериментальных условиях являются  $O_2^-$ -генерирующие ферментные системы клеток, такие, как НАД(Ф)Н-оксидаза.

ДГЭАС в концентрациях от 50 до 200 мкМ дозозависимо ингибировал продукцию  $H_2O_2$  в клетках тимуса. Как видно на рис. 1, при концентрации ДГЭАС 200 мкМ уровень перекисей снижается более чем в 2 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 описанное супрессирующее влияние ДГЭА на глюкокортикоидиндуцированный лизис тимоцитов хорошо объясняется антиоксидантными свойствами этого гормона, проявляющимися, как показывают

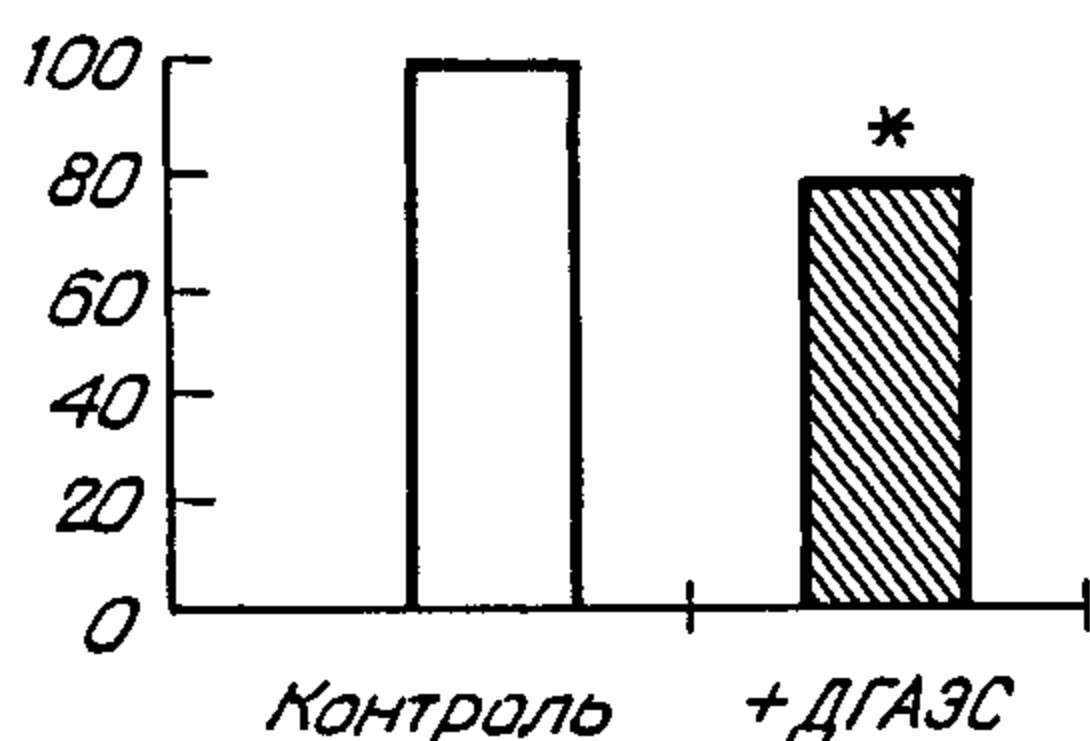


Рис. 2. Влияние ДГЭАС на скорость продукции супероксидного радикала клетками селезенки мышей BDF<sub>1</sub>.

По оси ординат — продукция O<sub>2</sub><sup>-</sup> (в % от контроля). К — контроль (продукция O<sub>2</sub><sup>-</sup> после подкожного введения растворителя — среды RPMI 1640); +ДГЭАС — продукция O<sub>2</sub><sup>-</sup> через 6 ч после подкожного введения ДГЭАС. Звездочка — достоверное отличие от контроля при p < 0,05 (n = 15).

полученные нами данные, снижением продукции АКМ клетками тимуса мышей.

Другим проявлением антиглюкокортикоидной активности ДГЭА можно считать его влияние на соотношение Th1- и Th2-клеток. Связь этого эффекта с антиоксидантными свойствами ДГЭА была проверена нами в опытах *in vivo*.

Введение ДГЭАС вызывало, как показано на рис. 2, достоверное снижение скорости образования O<sub>2</sub><sup>-</sup> в суспензии спленоцитов, где основным источником АКМ является НАД(Ф)Н-оксидазный комплекс клеток—фагоцитов. Аналогичным образом изменялась после введения гормона и продукция O<sub>2</sub><sup>-</sup>, стимулированная добавлением в клеточную суспензию активатора НАД(Ф)Н-оксидазы продигозана (снижение стимулированной продукции O<sub>2</sub><sup>-</sup> до 74% от соответствующего контроля).

Параллельно было исследовано влияние ДГЭАС на соотношение Th1/Th2 в целостном организме. Ранее было установлено [3], что развитие гломерулонефрита в модели хронической РТПХ, использованной нами в качестве тест-системы, определяется сдвигом баланса Th1/Th2 в сторону Th2, и, следовательно, воздействуя на эту реакцию исследуемыми агентами, мы можем судить об их влиянии на соотношение Th1/Th2 по частоте возникновения гломерулонефрита. На рис. 3 и в таблице приведены результаты эксперимента с двукратным введением ДГЭАС мышам в ходе индукции хронической РТПХ. Как показывают эти данные, в такой дозировке гормон заметно тормозит развитие гломерулонефрита, хотя к концу срока наблюдения относительная частота случаев его возникновения на фоне гормонального воздействия сравнивается с величиной этого параметра в контрольной группе. Представляет интерес тот факт, что при этом аналогичные результаты получены как в группе, где ДГЭАС вводили мышам-реципиентам, так и в группе, где гормон вводили мышам-донорам. Исходя из этого, можно предположить, что основную роль в определении пути, по которому будет развиваться реакция (Th1-зависимые или Th2-зависимые варианты развития хронической РТПХ), играет функциональное состояние донорских Т-клеток, которые активируются при попадании в генетически чужеродный организм реципиента и которые могут при этом дифференцироваться как в Th1-клетки, так и в Th2-клетки в зависимости от пред-

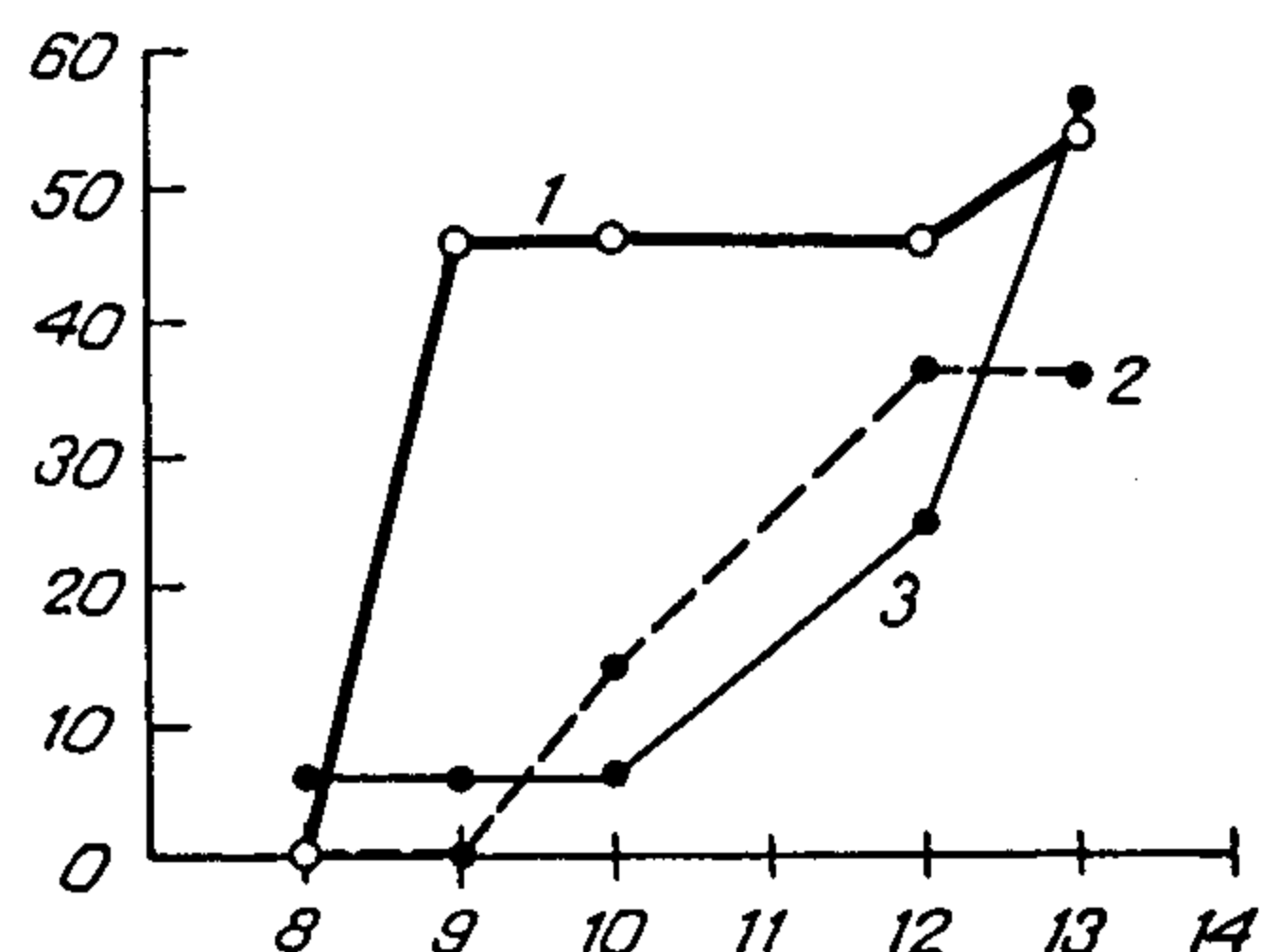


Рис. 3. Развитие иммунокомплексного гломерулонефрита у мышей с хронической РТПХ: эффект двукратного введения ДГЭАС.

Гормон вводили подкожно в дозе 0,75 мг на мышью за 1 сутки до первого и второго переноса клеток. По оси абсцисс — время после индукции РТПХ (в нед), по оси ординат — частота гломерулонефрита (в %). 1 — контрольная группа (перенос клеток интактных доноров интактным реципиентам, n = 13); 2 — перенос лимфоцитов доноров, которым вводили ДГЭАС, интактным реципиентам (n = 14); 3 — перенос лимфоцитов интактных доноров реципиентам, которым вводили ДГЭАС (n = 16).

шествующего преобладающего влияния на них различных эпигенетических воздействий (в данном случае от гормонального фона).

При действии более массивных доз гормона (при 4-кратном введении ДГЭАС мышам-реципиентам) наблюдается не только замедление развития Th2-зависимых процессов, ведущих к формированию стойкого поражения почечной ткани, но и изменение относительной частоты развития Th1- и Th2-зависимых клинических вариантов течения хронической РТПХ. Из данных, представленных на рис. 4, видно, что в серии опытов, где использовалась такая схема введения гормона, частота развития Th2-зависимого варианта РТПХ в экспериментальных группах более чем в 2 раза снижена по сравнению с этой величиной в контрольных группах животных. Следовательно, согласно полученным нами данным, ДГЭАС сдвигает соотношение Th1/Th2 в условиях *in vivo* в сторону относительного преобладания Th1-влияния на реакции, запускаемые иммунным конфликтом в целостном организме, что можно рассматривать как один из антиглюкокортикоидных эффектов ДГЭА. В пользу того, что в данном случае мы имеем дело с проявлением функционального антагонизма между действием глюкокортикоидов и ДГЭА на реакции, протекающие в иммунной системе, свидетельствуют как данные литературы [14, 21, 24], так и ре-

Уровень протеинурии (в мг/мл) в динамике развития хронической РТПХ после двукратного введения ДГЭАС

Время после индукции РТПХ, нед	Контрольная группа — двукратный перенос клеток интактных доноров интактным реципиентам (n = 13)	Двукратный перенос лимфоцитов доноров, которым вводили ДГЭАС, интактным реципиентам (n = 14)	Двукратный перенос лимфоцитов интактных доноров реципиентам, которым вводили ДГЭАС (n = 16)	Интактные мыши (без РТПХ) (n = 8)
8	1,36	0,70	0,69	0,68
9	2,47	0,59	0,88	0,55
10	3,08	1,82	1,05	0,25
12	3,10	2,45	1,64	0,26
13	2,53	2,19	2,81	0,79

Примечание. Условия опыта те же, что на рис. 3.

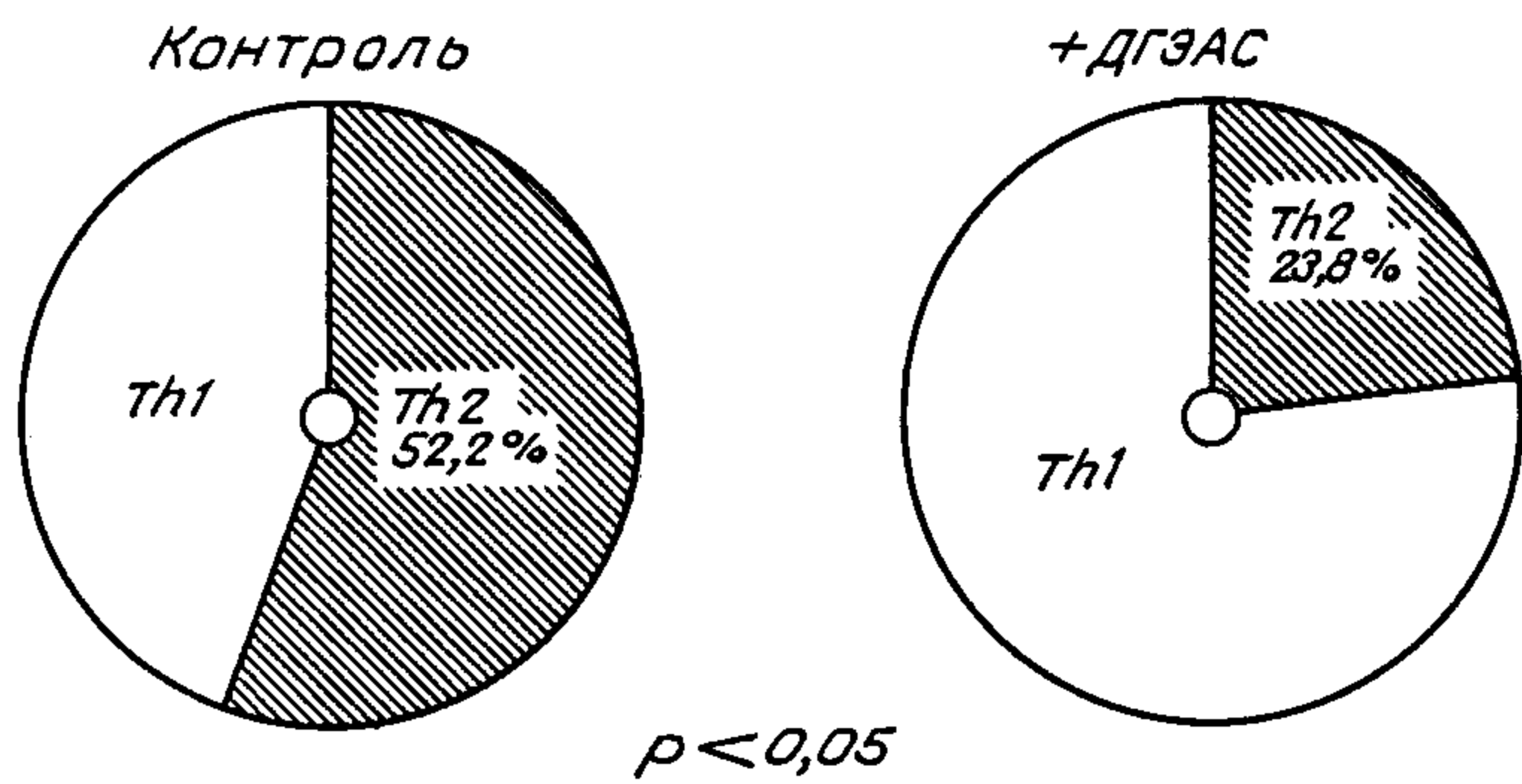


Рис. 4. Влияние 4-кратного введения ДГЭАС на частоту развития Th1- и Th2-зависимых клинических вариантов хронической РТПХ.

Гормон вводили реципиентам подкожно в дозе 0,75 мг на мышь за 1 сут до первого и второго переноса донорских клеток, а также на 3-и сутки после каждого такого переноса. Контроль — группа без введения гормона ( $n = 23$ ); +ДГЭАС — группа с 4-кратным введением гормона ( $n = 21$ ).

результаты, полученные нами ранее на модели хронической РТПХ [6].

Антиоксидантные свойства ДГЭА описаны впервые более 20 лет назад [29], однако имеющиеся на сегодняшний день данные по этому поводу разрознены и противоречивы. Так, в экспериментах *in vitro* показано ингибирующее влияние ДГЭА на продукцию  $O_2^-$  макрофагами человека и животных [13, 17, 20]. В то же время в других исследованиях обнаружена стимуляция образования свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов в печени крыс после кормления их пищей, содержащей этот гормон [25], и снижение продукции  $O_2^-$  нейтрофилами пожилых людей, у которых было увеличено отношение гидрокортизон/ДГЭА [11]. Полученные нами в экспериментах *in vivo* результаты однозначно свидетельствуют о том, что в клетках иммунной системы ДГЭАС в использованной дозе подавляет базальную и стимулированную продукцию АКМ, и, следовательно, его влияние на функциональные свойства лимфоцитов может объясняться этим эффектом.

Таким образом, основываясь на результатах проведенного исследования, можно сделать вывод, что одним из возможных механизмов действия ДГЭА на иммунную систему является его ингибирующее влияние на внутриклеточную продукцию АКМ, которым объясняется как его антиглюкокортикоидный эффект при дексаметазониндуцированном апоптозе тимоцитов, так и влияние ДГЭА на

баланс Th1/Th2 в организме, противоположное действию глюкокортикоидных гормонов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вольский Н. Н., Козлов В. А., Лозовой В. П. // Бюл. exper. биол. — 1987. — Т. 53, № 6. — С. 694—696.
2. Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Вольский Н. Н. и др. // Успехи соврем. биол. — 1999. — Т. 119, № 5. — С. 440—450.
3. Козлов В. А., Кудаева О. Т., Колесникова О. П. и др. // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 3. — С. 143—146.
4. Колесникова О. П., Кудаева О. Т., Логинов В. А. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 12. — С. 13—16.
5. Корнеев Г. Я. // Физиология эндокринной системы. — Л., 1979. — С. 285—324.
6. Кудаева О. Т., Колесникова О. П. // Rus. J. Immunol. — 2004. — Vol. 9, Suppl. 1. — P. 15.
7. Обум Т. А. Андрогены в адаптации организма: биологическая значимость надпочечниковых андрогенов. — Новосибирск, 2004.
8. Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R. et al. // J. Immunol. — 1983. — Vol. 130, N 4. — P. 1910—1917.
9. Blauer K. L., Poth M., Rogers W. M. et al. // Endocrinology. — 1991. — Vol. 129, N 6. — P. 3174—3179.
10. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
11. Butcher S. K., Killampalli V., Lascelles D. et al. // Aging Cell. — 2005. — Vol. 4, N 6. — P. 319—324.
12. Butke T. M., Sandstrom P. A. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15, N 1. — P. 7—10.
13. Heffner J. E., Milam M. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 2, N 3. — P. 257—261.
14. Khorram O., Vu L., Yen S. S. // J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci. — 1997. — Vol. 52, N 1. — M1—M7.
15. May M., Holmes E., Rogers W. M. et al. // Life Sci. — 1990. — Vol. 46, N 22. — P. 1627—1631.
16. McCarty M. F. // Med. Hypothes. — 1997. — Vol. 48, N 1. — P. 47—54.
17. Mohan P. F., Jacobson M. S. // Am. J. Med. Sci. — 1993. — Vol. 306, N 1. — P. 10—15.
18. Nephew K. P., Sheeler C. Q., Dudley M. D. et al. // Mol. Cell. Endocrinol. — 1998. — Vol. 143, N 1—2. — P. 133—142.
19. Nestler J. E., Clore J. N., Blackard W. G. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 40, N 4—6. — P. 599—605.
20. Rom W. N., Harkin T. // Environ. Res. — 1991. — Vol. 55, N 2. — P. 145—156.
21. Rook G. A., Hernandez-Pando R., Lightman S. L. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15, N 7. — P. 301—303.
22. Stam W. B., Van Oosterhout A. J., Nijkamp F. P. // Life Sci. — 1993. — Vol. 53, N 26. — P. 1921—1934.
23. Stevens C. M., Bush J. A. // J. Biol. Chem. — 1950. — Vol. 183, N 1. — P. 139—147.
24. Suitters A. J., Shaw S., Wales M. R. et al. // Immunology. — 1997. — Vol. 91, N 2. — P. 314—321.
25. Swierczynski J., Mayer D. // Nutr. and Cancer. — 1998. — Vol. 32, N 2. — P. 101—106.
26. Valenti G. // J. Endocrinol. Invest. — 2002. — Vol. 25, N 10. — Suppl. — P. 29—35.
27. Volsky N. N., Persijanova V. O., Kozlov V. A. // Rus. J. Immunol. — 2001. — Vol. 6, N 2. — P. 147—156.
28. Watson R. R., Huls A., Araghinikouam M. et al. // Drugs Aging. — 1996. — Vol. 9, N 4. — P. 274—291.
29. Whitcomb J. M., Schwartz A. G. // Carcinogenesis. — 1985. — Vol. 6, N 3. — P. 333—335.

Поступила 04.08.06