

УДК 612.411.017.1:612.262].014.46:615.357.453

Ключевые слова: селезенка; супероксидный радикал; гидрокортизон

*Н. Н. Вольский, В. А. Козлов, В. П. Лозовой*

## ВЛИЯНИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА НА ПРОДУКЦИЮ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА ФАГОЦИТИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ СЕЛЕЗЕНКИ

Институт клинической иммунологии Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Известно, что глюкокортикоидные гормоны обладают выраженным иммуномодулирующим свойством и являются одним из важнейших эндогенных регуляторов иммунного ответа. В связи с этим хорошо изучено действие глюкокортикоидов на миграцию, пролиферацию и функции лимфоцитов и их отдельных популяций [2, 6]. Значительно менее исследовано действие этих гормонов на функциональное состояние фагоцитирующих клеток — нейтрофилов и макрофагов, которые не

только имеют значения эффекторов, но и играют ведущую роль в регуляции иммунных процессов.

Цель данной работы — исследование влияния гидрокортизона (ГК) на одну из важнейших метаболических функций клеток-фагоцитов — продукцию супероксидного радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Методика исследования. Опыты проводили на мышах-самцах линии СВА в возрасте 2—4 мес, полученных из питомника «Столбовая» АМН СССР. Гидрокортизон-ацетат («Гедеон Рихтер», ВНР) вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 1 мг/мышь в виде суспензии в среде 199. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили такой же объем среды 199. Через определенные сроки после введения ГК мышей забивали (контрольных и подопытных одновременно) и оценивали продукцию  $O_2^{\cdot-}$  по скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), используя метод [8] с небольшими модификациями. Для этого клетки селезенки инкубировали в течение 30—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»,

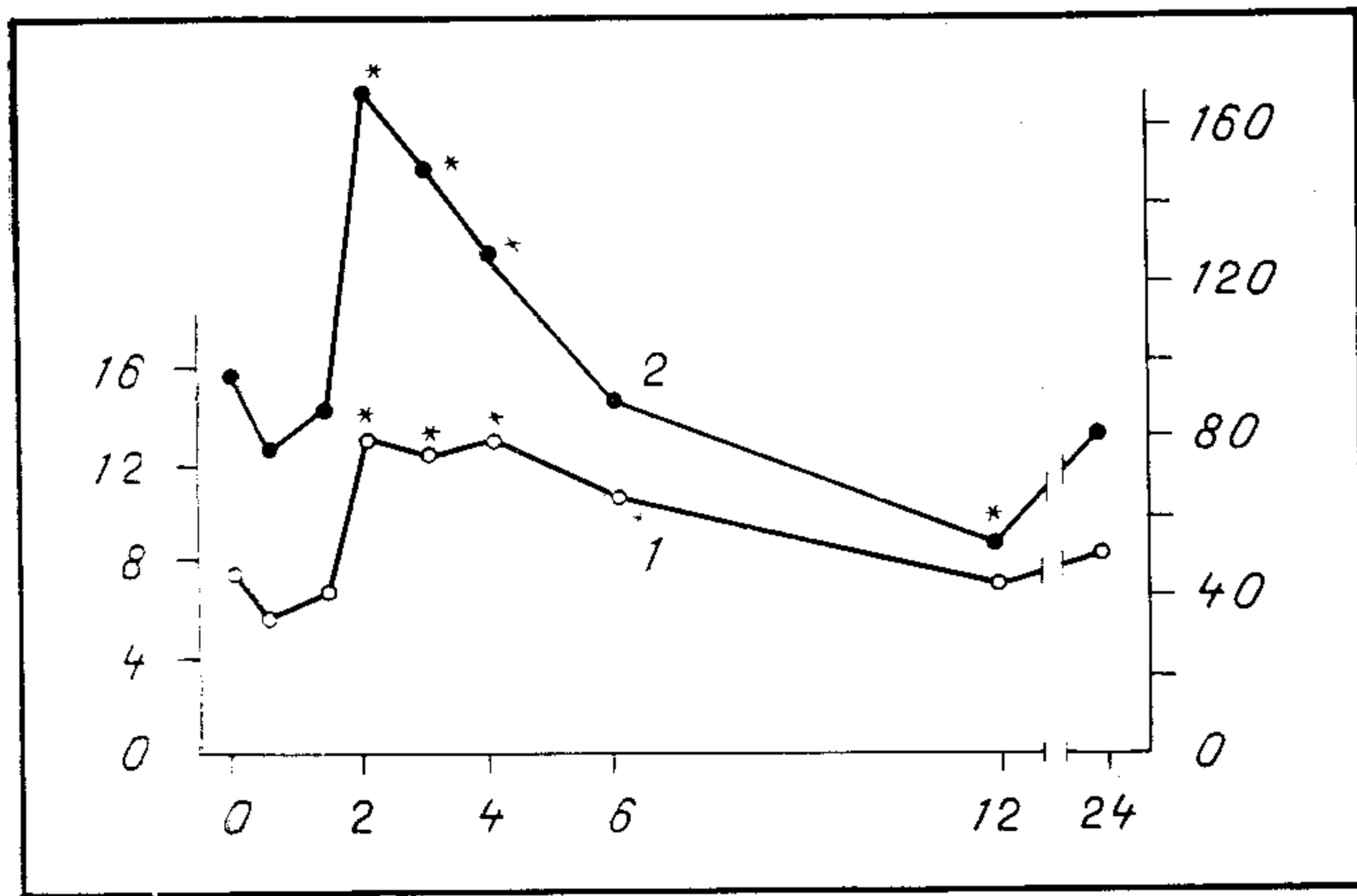


Рис. 1. Продукция супероксидного радикала фагоцитирующими клетками селезенки мышей через различные сроки после введения ГК.

1 — продукция  $O_2^{\cdot -}$  в ед./ $10^6$  клеток; 2 — продукция  $O_2^{\cdot -}$  в ед./селезенку. По оси абсцисс — время после введения ГК (в ч); по оси ординат — продукция  $O_2^{\cdot -}$  (слева — в ед./ $10^6$  клеток, справа — в ед./селезенку).

США). В качестве фагоцитируемого материала в инкубационную среду добавляли латекс в концентрации 1 мг/мл. Образовавшийся формазан осаждали 0,5 н. HCl и растворяли в 3 мл пиридина, после чего измеряли оптическую плотность при 570 нм на спектрофотометре СФ-26. Результаты выражали в условных единицах. За едини-

цу активности принимали увеличение оптической плотности при 570 нм на 0,001 оптической единицы за 45 мин.

В некоторых опытах различные дозы ГК добавляли в 45 мкл этилового спирта к суспензии спленоцитов интактных мышей непосредственно перед определением продукции  $O_2^{\cdot -}$ . Для ингибирования ДНК-зависимого синтеза РНК в спленоцитах их инкубировали в среде 199, содержащей 10 мкг/мл актиномицина D («Serva», ФРГ), в течение 1,5 ч при 37°C [4].

Чтобы определить скорость продукции  $O_2^{\cdot -}$  в условиях избытка донора электронов, в среду инкубации добавляли различные концентрации НАД·Н<sub>2</sub> («Reanal», ВНР). Величины  $V_{max}$  и  $K_m$  для НАД·Н<sub>2</sub> определяли при этом графически, используя метод двойных обратных величин [1]. Аппроксимацию полученных экспериментальных данных линейными уравнениями проводили по методу наименьших квадратов [5]. Достоверность полученных различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни.

Результаты исследования. Из полученных данных следует, что продукция активных форм кислорода фагоцитирующими клетками селезенки увеличивается в 1,8 раза уже через 2 ч после введения ГК, остается повышенной в течение 2—3 ч, а затем к 12 ч после введения снижается и в дальнейшем не отличается от исходной (рис. 1). Аналогичная динамика продукции  $O_2^{\cdot -}$  наблюдается и при расчете этого показателя на селезенку в целом (см. рис. 1).

Реакция одновалентного восстановления молекул кислорода с образованием  $O_2^{\cdot -}$  катализируется ферментом НАД·Н-оксидазой, расположенным в плазматической мембране клеток-фагоци-

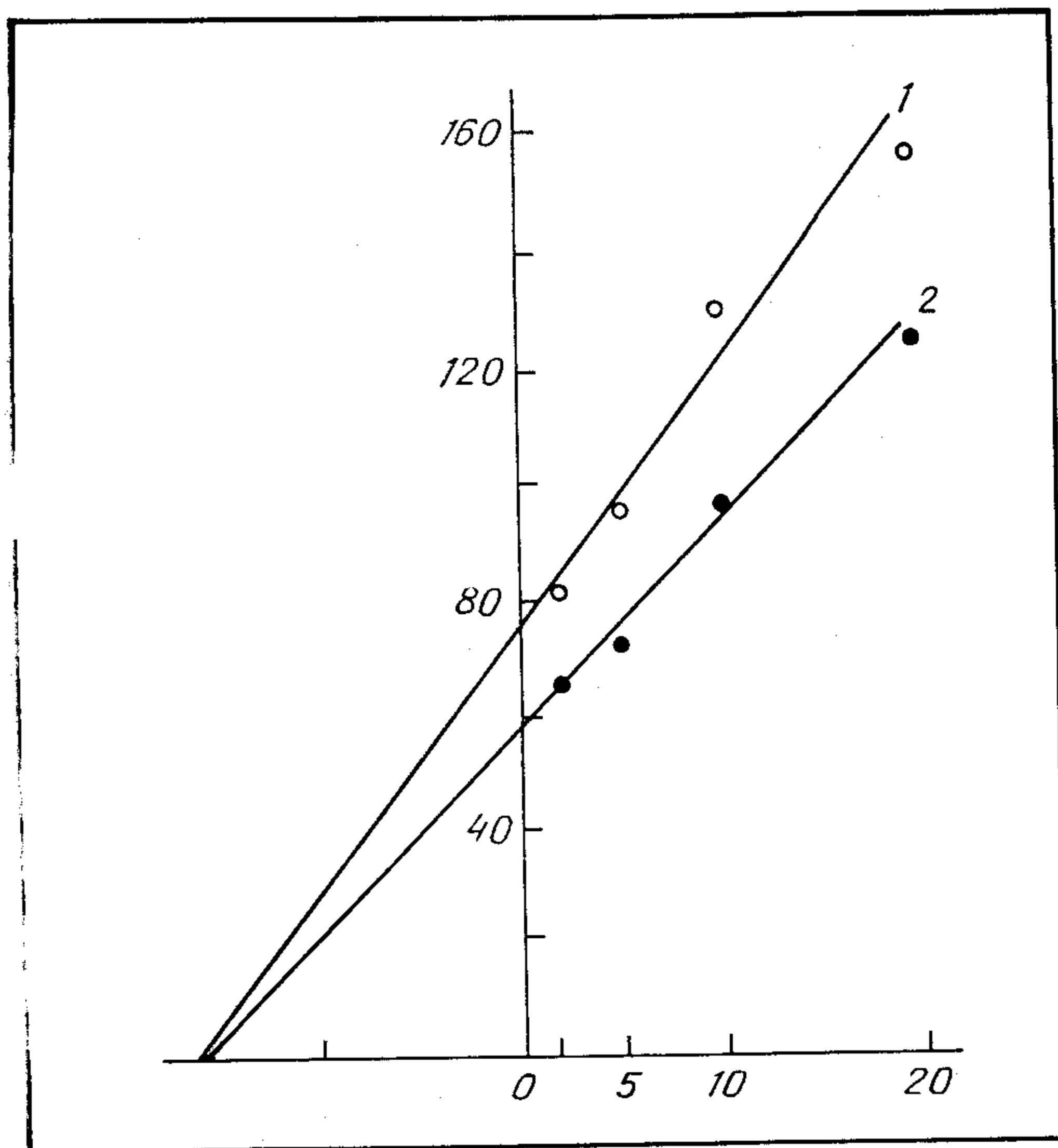


Рис. 2. Влияние ГК на кинетические параметры НАДФХ·Н-оксидазы фагоцитирующих клеток селезенки мышей. 1 — контроль; 2 — через 3 ч после внутрибрюшинного введения ГК в дозе 50 мг/кг. По оси абсцисс — (концентрация НАД·Н<sub>2</sub>)<sup>-1</sup> · 10<sup>3</sup>. По оси ординат — продукция  $O_2^{\cdot -}$  · 10<sup>3</sup>.

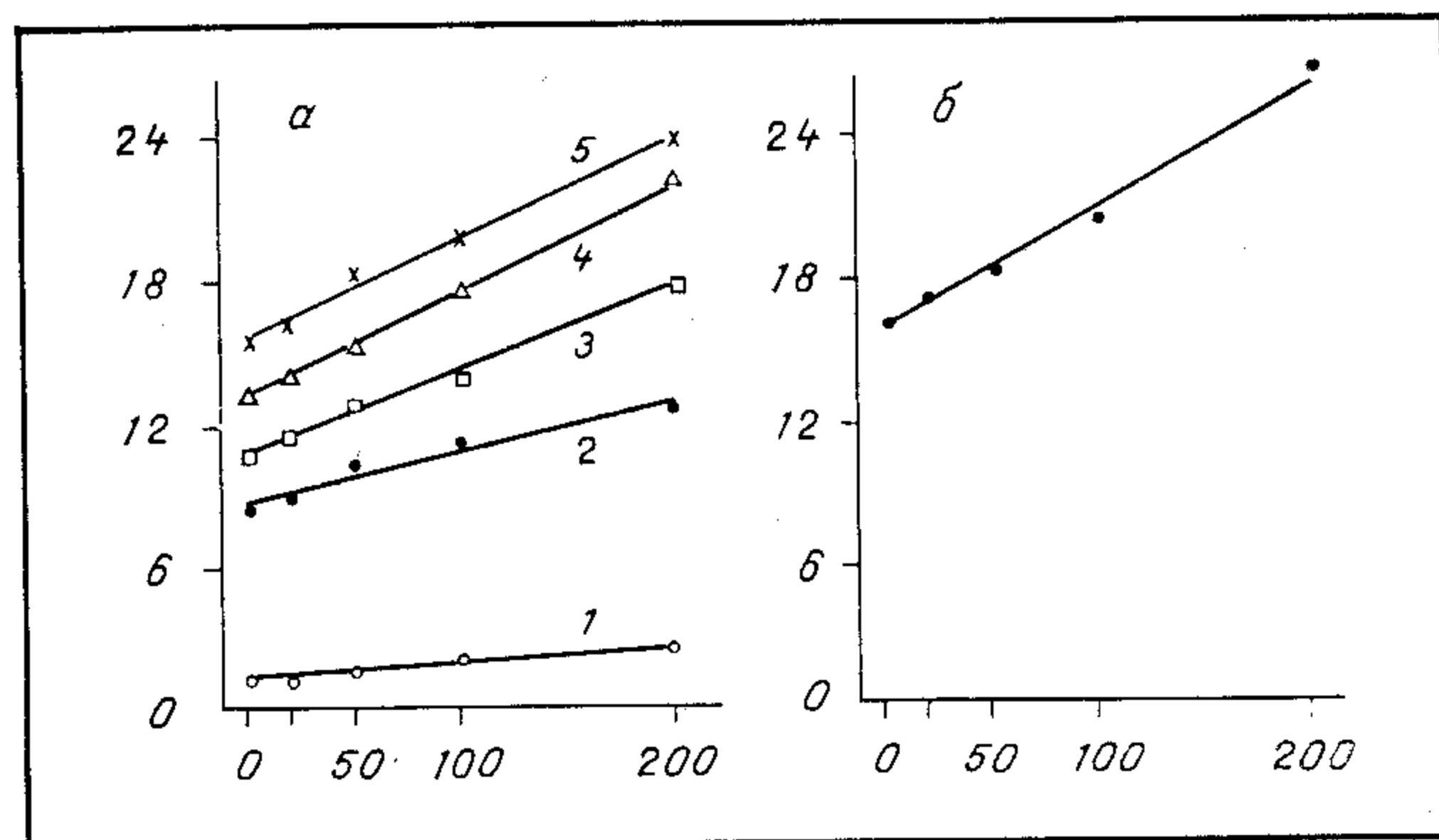


Рис. 3. Влияние различных концентраций ГК на скорость продукции супероксидного радикала фагоцитирующими клетками селезенки мышей.

а — скорость продукции  $O_2^{\cdot -}$  при различных концентрациях НАД·Н<sub>2</sub> в инкубационной среде. 1 — контроль; 2—5 — 50, 100, 200 и 500 мкМ НАД·Н<sub>2</sub> соответственно; б — максимальная скорость продукции  $O_2^{\cdot -}$ . По оси абсцисс — концентрация ГК (в мкМ). По оси ординат — продукция  $O_2^{\cdot -}$  (в ед./ $10^6$  клеток).

тов. Установлено, что в физиологических условиях этот фермент в качестве донора электронов использует внутриклеточный НАДФ·Н<sub>2</sub>, но при экзогенном добавлении восстановленных пиридиннуклеотидов фермент может использовать как НАДФ·Н<sub>2</sub>, так и НАД·Н<sub>2</sub> [7]. Поскольку скорость продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup> НАДФ·Н-оксидазой зависит как от активности самого фермента (от его количества и кинетических параметров), так и от уровня восстановленных пиридиннуклеотидов в клетке, мы исследовали скорость этой реакции (до и после введения ГК) в присутствии различных концентраций экзогенно добавленного НАД·Н<sub>2</sub>. Результаты одного из таких опытов показаны на рис. 2. Видно, что при добавлении экзогенного донора электронов скорость продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup> фагоцитирующими клетками селезенки увеличивается, подчиняясь кинетике Михаэлиса-Ментен. При этом кажущаяся  $K_M$  для НАД·Н<sub>2</sub> в суспензии живых клеток селезенки мышей линии СВА была равна  $62 \pm 12$  мкМ. Величина  $V_{max}$  для этой реакции была равна  $26,4 \pm 9,0$  ед/10<sup>6</sup> клеток. У животных, которым за 3 ч до забоя вводили 50 мг/кг ГК, величина  $V_{max}$  увеличивалась на 40—50 % без заметных изменений величины  $K_M$  для НАД·Н<sub>2</sub>.

Для выяснения механизма действия ГК мы исследовали его влияние *in vitro* в опытах, где к суспензии клеток, взятых у интактных животных, ГК добавлялся в среду инкубации непосредственно перед определением скорости продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup>. Показано, что при всех использованных концентрациях НАД·Н<sub>2</sub> (и без него) добавление ГК приводило к увеличению продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup>, при этом скорость реакции линейно возрастала с увеличением концентрации ГК (рис. 3). Построенный по этим данным график зависимости  $V_{max}$  НАДФ·Н-оксидазы от концентрации ГК в инкубационной среде (см. рис. 3, б) представляет собой прямую линию, т. е. прирост активности НАДФ·Н-оксидазы прямо пропорционален концентрации ГК.

Так как в наших опытах эффект ГК проявлялся за время инкубации (30 мин), можно сделать вывод, что лаг-период его действия не превышает нескольких минут. Столь быстрое влияние ГК, по-видимому, не может быть объяснено классическим механизмом действия стероидных гормонов, включающим рецепцию гормона, его перенос в ядро, взаимодействие с генетическим аппаратом клетки и синтез специфических мРНК и белка, что требует сроков, измеряемых в часах. Поскольку в литературе имеются многочисленные данные о непосредственном действии глюкокортикоидных гормонов на клеточные мембраны [3], можно предположить, что и в данном случае влияние ГК на продукцию О<sub>2</sub><sup>-</sup> опосредовано его прямым действием на плазматическую мембрану клеток-фагоцитов, активирующим мембраносвязанную НАДФ·Н-оксидазу. В пользу

такого предположения говорят и результаты наших опытов с актиномицином D, ингибирующим ДНК-зависимый синтез РНК. Если клетки селезенки перед добавлением 200 мкМ ГК предварительно инкубировались в среде, содержащей актиномицин D, то это практически не влияло на стимуляцию продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup> гормоном (величины продукции О<sub>2</sub><sup>-</sup> в присутствии 500 мкМ НАД·Н<sub>2</sub>: в контроле 21,3 ед/10<sup>6</sup> клеток, с ГК 36,5 ед/10<sup>6</sup> клеток, с СГ после инкубации с актиномицином D 40,6 ед/10<sup>6</sup> клеток).

Данные литературы [9, 10] о влиянии глюкокортикоидных гормонов на продукцию О<sub>2</sub><sup>-</sup> клетками-фагоцитами говорят об ингибирующем действии гормонов на данную метаболическую функцию. Но в этих исследованиях эффект регистрировался лишь через несколько часов или дней после начала действия гормона. Наши результаты показывают, что одним из самых ранних действий глюкокортикоидов на функциональную активность фагоцитирующих клеток селезенки — главного органа, где происходит гуморальный иммунный ответ, — является стимуляция их метаболической активности, и это может быть связано с иммуномодулирующим эффектом глюкокортикоидных гормонов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: Пер. со 2-го англ. изд. — М., 1966.
2. Корнева Е. А., Клименко В. М., Шхинек Э. К. Нейрогуморальное обеспечение иммунного гомеостаза. — Л., 1978.
3. Сергеев П. В. Стероидные гормоны. — М., 1984.
4. Стерлина А. Г., Богдашин И. В., Фукс Б. Б. // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 6. — С. 97.
5. Цветков А. И. Прикладные программы для микроЭВМ «Электроника БЗ-21». — М., 1982.
6. Чеботарев В. Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза. — Киев, 1979.
7. Allen R. C., Yevich S. J., Orth R. W. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1974. — Vol. 60, N 3. — P. 909.
8. Baehner R. L., Nathan D. G. // New Engl. J. Med. — 1968. — Vol. 278, N 4. — P. 971.
9. Clemmensen O., Andersen V., Hansen N. E. et al. // Acta med. scand. — 1976. — Vol. 199, N 1. — P. 105.
10. Miller D. R., Kaplan H. G. // Pediatrics. — 1970. — Vol. 45, N 3. — P. 861.

Поступила 03.10.86

#### EFFECT OF HYDROCORTISONE ON SUPEROXIDE RADICAL PRODUCTION BY PHAGOCYtic SPLEEN CELLS

N. N. Volsky, V. A. Kozlov, V. P. Lozovoy

Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

Superoxide radical production by mouse phagocytic spleen cells was shown to be essentially increased 2 hours following intraperitoneal injection of hydrocortisone acetate at a dose of 50 mg/kg body weight. The addition of hydrocortisone to the suspension of mouse spleen cells has resulted in linear dependence of hormone concentration in the incubation medium on the maximum rate of superoxide radical production. The mechanism of hydrocortisone stimulating effect on the activity of plasma membrane-located NAD(P)H-oxidase of phagocytic cells is being discussed.