

УДК 577.175.5/616-002.2:57.084.1

АКТИВНОСТЬ 11В-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГРАНУЛЕМАТОЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ^{1,2}Черкасова О.П., ¹Селятицкая В.Г., ¹Пальчикова Н.А.¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск, e-mail: csem@soram.ru;²Институт лазерной физики СО РАН, Новосибирск, e-mail: o.p.cherkasova@gmail.com

В работе исследовали активность ключевого фермента пререцепторного метаболизма глюкокортикоидных гормонов 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы (11 β -ГСД) в надпочечниках, коре почек и печени, а также содержание кортикостероидных гормонов в надпочечниках крыс, в динамике развития хронического гранулематозного воспаления, вызванного введением диоксида кремния. В первые сутки после индукции воспаления у опытных крыс наблюдали увеличение содержания кортикостерона и его обратимого метаболита 11-дегидрокортикостерона (11ДГКС) в надпочечниках на фоне снижения более чем в два раза содержания прогестерона относительно величин исследованных показателей у контрольных животных. На 3 сутки содержание кортикостерона в надпочечниках снижалось; еще более выраженное снижение его содержания было отмечено на 14 сутки. Содержание альдостерона на 14 сутки эксперимента также снижалось более чем в два раза, но содержание прогестерона увеличивалось при этом в 2,5 раза, что свидетельствует об ингибировании конечных этапов биосинтеза кортикостероидных гормонов. На 14 сутки эксперимента активность первой изоформы фермента 11 β -ГСД в печени была повышена, а активность второй изоформы 11 β -ГСД в почках снижена, что привело к увеличению отношения активностей 11 β -ГСД в печени и почках в два раза. Подобные изменения активностей изоформ 11 β -ГСД способствуют повышению концентрации кортикостерона в крови в условиях снижения его синтеза в надпочечниках. На 22 сутки воспаления величины изученных показателей возвращались к значениям соответствующих показателей у контрольных животных, но содержание 11ДГКС в надпочечниках снижалось, что указывает на его использование в качестве субстрата для восстановления содержания кортикостерона в железе.

Ключевые слова: 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа, кортикостерон, 11-дегидрокортикостерон, хроническое гранулематозное воспаление, высокоэффективная жидкостная хроматография

11 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY IN TISSUES OF RATS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS INFLAMMATION^{1,2}Cherkasova O.P., ¹Selyatitskaya V.G., ¹Palchikova N.A.¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, e-mail: csem@soram.ru;²Institute of Laser Physics SB RAS, Novosibirsk, e-mail: o.p.cherkasova@gmail.com

The activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD), a key enzyme of the pre-receptor metabolism of glucocorticoids, in the rat adrenal gland, kidney cortex and liver, as well as the content of corticosteroid hormones in the adrenal gland have been investigated in dynamics of silica induced chronic granulomatous inflammation. It was shown that levels of corticosterone and its reversible metabolite 11-dehydrocorticosterone (11DHCS) were increased in adrenal gland of experimental rats on the first day after the induction of inflammation. However content of progesterone in adrenal gland of experimental rats was two times lower than that in the control rats. On day 3 the content of corticosterone in the adrenal glands decreased; even more marked reduction of its content was observed at day 14. The content of aldosterone on the 14th day of the experiment was more than two times lower, but the content of progesterone was 2.5 times higher than in control rats, indicating that the inhibition of the final stages of corticosteroid biosynthesis pathways observed. On day 14 of the experiment the activity of 11 β -HSD type 1 in the liver was increased and the activity of 11 β -HSD type 2 in the kidneys was reduced, resulting in twice increase of ratio of 11 β -HSD activities in the liver and kidneys. Such changes in activities of 11 β -HSD isoforms made for increasing the blood corticosterone concentration under conditions of decreased synthesis this hormone in the adrenal glands. On day 22 the levels of studied parameters were returning to that of the control animals, but the content of 11DHCS in adrenal glands was decreased, indicating that its use as a substrate for the recovery of adrenal corticosterone content.

Keywords: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, corticosterone, 11-dehydrocorticosterone, chronic granulomatous inflammation, high performance liquid chromatography

Синтез глюкокортикоидных гормонов в основном происходит в коре надпочечников, но в организме осуществляется и вненадпочечниковый синтез этих гормонов ферментом пререцепторного метаболизма глюкокортикоидных гормонов 11 β -гидроксистероиддегидрогеназой (11 β -ГСД), катализирующим взаимные превращения кортизола и его неактивного метаболита

кортизона у человека, кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона (11ДГКС) у грызунов. Показано, что вклад 11 β -ГСД во вненадпочечниковый синтез кортизола составляет до 30% от его синтеза в надпочечнике здорового человека [8]. Первая изоформа этого фермента (11 β -ГСД-I) локализована с глюкокортикоидными рецепторами, является оксидоредуктазой

и *in vivo* катализирует преимущественно реакцию восстановления 11-дегидрокортикостерона в кортикостерон. Изоформа фермента 11 β -ГСД-I обнаружена в печени, гиппокампе, легких и жировой ткани [4, 8]. Вторая изоформа фермента (11 β -ГСД-II) локализована с минералокортикоидными рецепторами, осуществляет превращение активных глюкокортикоидных гормонов в неактивные метаболиты в тканях-мишенях альдостерона, обеспечивая тем самым селективность этих рецепторов [4].

Глюкокортикоидные гормоны оказывают выраженное иммуномодулирующее действие в норме и при различных патологических состояниях, включая воспаление. Медиаторы воспаления, в свою очередь, также могут влиять на активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы. Так, например, было показано, что при индукции гранулематозного воспаления у экспериментальных животных грибами рода *Candida*, вакциной БЦЖ активность адренкортикальной системы претерпевает фазные изменения с периодами гипокортицизма [3, 9]. При хроническом гранулематозном воспалении, вызванном введением двуокиси кремния, у экспериментальных животных после первоначального подъема снижался уровень кортикостерона в крови, а также изменялось содержание прогестерона и кортикостерона в надпочечниках [6, 10]. Однако оставалось неизученным, была ли при этом изменена активность процессов вненадпочечникового синтеза кортикостерона.

Цель исследования: изучить активность 11 β -ГСД в надпочечниках, печени

и почках крыс, а также содержание кортикостероидных гормонов в надпочечниках, в динамике развития хронического гранулематозного воспаления.

Материалы и методы исследования

Работа проведена на половозрелых крысах-самцах породы Вистар ($n = 57$), которых содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. При работе с животными соблюдали принципы гуманности, изложенные в Хельсинкской декларации. Хроническое гранулематозное воспаление вызывали согласно ранее разработанному способу [7] путем однократного введения в хвостовую вену суспензии монокристаллов диоксида кремния (S-563, 100 мг/кг массы тела, размер частиц 1–5 мкм) в 0,8 мл физиологического раствора. В контрольной группе животным однократно вводили аналогичный объем физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 14 и 22 суток после инъекции индуктора воспаления. Содержание прогестерона в гомогенатах надпочечников определяли иммуноферментным методом с использованием наборов Стероид ИФА-прогестерон (ЗАО «Алкор БИО»). Содержание кортикостероидных гормонов в гомогенатах надпочечников и плазме крови крыс [5], а также активность 11 β -ГСД в гомогенатах почек и печени [4] определяли разработанными нами методами с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Активность 11 β -ГСД в надпочечниках определяли по отношению содержания кортикостерона к содержанию 11ДГКС в надпочечниках.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6» (Statsoft, США). Результаты оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5%-м уровне значимости. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Работу выполняли с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

Таблица 1

Содержание кортикостероидных гормонов (мг/г) и активность 11 β -ГСД (усл.ед.) в надпочечниках крыс в динамике гранулематозного воспаления, индуцированного диоксидом кремния ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 22$)	Сутки после введения диоксида кремния			
		1 ($n = 6$)	3 ($n = 10$)	14 ($n = 10$)	22 ($n = 9$)
Прогестерон	$0,41 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,02^*$	$0,25 \pm 0,1$	$1,06 \pm 0,32^{*#}$	$0,34 \pm 0,14$
11-дезоксикортикостерон	$0,75 \pm 0,15$	$0,94 \pm 0,23$	$0,71 \pm 0,26$	$0,79 \pm 0,17$	$0,56 \pm 0,3$
Альдостерон	$0,51 \pm 0,11$	$0,69 \pm 0,24$	$0,56 \pm 0,17$	$0,24 \pm 0,07^{*#}$	$0,54 \pm 0,17$
Кортикостерон	$5,03 \pm 1,17$	$12,39 \pm 3,2^*$	$2,54 \pm 1,02^{*#}$	$1,40 \pm 0,50^{*#}$	$4,68 \pm 1,80$
11-Дегидрокортикостерон	$1,91 \pm 0,31$	$4,02 \pm 0,58^*$	$2,19 \pm 0,67^a$	$1,84 \pm 0,34^{\#}$	$1,0 \pm 0,28^{*+ \$}$
11 β -ГСД	$2,5 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,2^{*#}$	$0,6 \pm 0,12^{*#}$	$5,8 \pm 1,9^{*,+ \$}$

П р и м е ч а н и е. n – число животных в группе; статистическая значимость различий величин при парных сравнениях: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными животными; # – $p < 0,05$ по сравнению с животными в первые сутки воспаления; + – $p < 0,01$ по сравнению с животными в 3 сутки воспаления; \$ – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 14 сутки воспаления.

Таблица 2

Содержание кортикостероидных гормонов в плазме крови (нг/мл)
и активность 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы в тканях (нмоль $\times$ мин $^{-1}\times$ г $^{-1}$)
в динамике воспаления, индуцированного диоксидом кремния ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n = 19)	Сутки после введения диоксида кремния			
		1 (n = 6)	3 (n = 10)	14 (n = 10)	22 (n = 9)
Кортикостерон	56,1 $\pm$ 8,4	111,7 $\pm$ 231,5*	35,8 $\pm$ 12,2#	48,0 $\pm$ 17,5	73,7 $\pm$ 16,4+
11-Дегидро-кортикостерон	8,8 $\pm$ 1,4	9,8 $\pm$ 4,6	20,6 $\pm$ 6,0*	9,4 $\pm$ 3,2+	10,6 $\pm$ 4,4
Активность 11 β -ГСД почек	8,6 $\pm$ 1,1	–	10,6 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 0,4
Активность 11 β -ГСД печени	241,1 $\pm$ 13,5	–	237,1 $\pm$ 34,3	293,0 $\pm$ 30,6*+	247,4 $\pm$ 21,9
Отношение активности 11 β -ГСД в печени к ее активности в почках	26,2 $\pm$ 2,8		24,0 $\pm$ 4,3	49,4 $\pm$ 9,5*+§	22,4 $\pm$ 1,9

Примечание. n – число животных в группе; статистическая значимость различий величин при парных сравнениях: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными животными; # – $p < 0,05$ по сравнению с животными в первые сутки воспаления; + – $p < 0,01$ по сравнению с животными в 3 сутки воспаления; § – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 22 сутки воспаления.

Результаты исследования и их обсуждение

В первые сутки после введения диоксида кремния крысам наблюдали классическую картину реакции активации аденокортикальной системы при остром стрессе – увеличение содержания глюкокортикоидного гормона кортикостерона в надпочечниках (табл. 1). При этом отмечалось снижение содержания в надпочечниках предшественника глюкокортикоидных гормонов прогестерона. На 3 сутки эксперимента содержание кортикостерона в надпочечниках снижалось относительно величины этого показателя у контрольных крыс; еще более выраженное снижение содержания кортикостерона было отмечено на 14 сутки (в 3,8 раза). Содержание альдостерона на 14 сутки эксперимента также снижалось более чем в два раза. При этом содержание прогестерона увеличивалось в 2,5 раза, что свидетельствует об ингибировании именно конечных этапов биосинтеза кортикостероидных гормонов на 14 сутки эксперимента. Содержание метаболита кортикостерона 11ДГКС в надпочечниках, напротив, не отличалось от величины соответствующего показателя у контрольных животных на 3 и 14 сутки эксперимента. На 14 сутки эксперимента содержание метаболита превышало содержание основного глюкокортикоидного гормона кортикостерона в 1,3 раза, тогда как у контрольных животных содержание кортикостерона в 2,6 раза выше, чем содержание 11ДГКС.

Активность 11 β -ГСД в надпочечнике на 3 и 14 сутки эксперимента была значительно ниже уровня активности, наблюдаемой

у контрольных животных (табл. 1). Поскольку надпочечники крыс содержат обе изоформы фермента 11 β -ГСД, полученные результаты позволяют предполагать, что на 3 и 14 сутки хронического гранулематозного воспаления происходит ингибирование активности первой изоформы 11 β -ГСД-I, осуществляющей превращение неактивного метаболита 11ДГКС в кортикостерон. Вторая изоформа 11 β -ГСД-II, которая осуществляет превращение кортикостерона в неактивный 11ДГКС, на данном этапе эксперимента не ингибируется. На последнем этапе эксперимента на 22 сутки после индукции воспаления диоксидом кремния содержание кортикостерона в надпочечниках восстанавливалось до величины соответствующего показателя у контрольных животных. Содержание 11ДГКС при этом снижалось, указывая на его использование в качестве субстрата в восстановлении содержания кортикостерона в железе.

Содержание кортикостерона в плазме крови в первые сутки после введения диоксида кремния возросло в два раза по сравнению с контрольными крысами, в последующие дни оно значительно снизилось, а с 14 суток начало восстанавливаться (табл. 2).

На 14 сутки после индукции воспаления активность 11 β -ГСД в печени достоверно увеличивалась. Это может быть связано с тем, что указанный период хронического гранулематозного воспаления характеризуется активным формированием гранул в печени [1, 2]. При этом активность 11 β -ГСД в почках имела тенденцию к снижению. Указанные изменения активности изоформ 11 β -ГСД

в печени и почках особенно отчетливо видны при расчете отношения их активностей, величина которого на 14 сутки эксперимента увеличилась в два раза (табл. 2). Такое изменение активностей изоформ 11 β -ГСД в печени и почках способствует поддержанию концентрации основного глюкокортикоидного гормона в крови при выраженном снижении его продукции в надпочечниках. На возможность подобного механизма поддерживать концентрацию кортикостерона указывают сведения о том, что образование основного глюкокортикоидного гормона в печени из его метаболита составляет 30–40% от продукции в надпочечниках [8].

На 22 сутки после введения крысам диоксида кремния содержание гормонов в крови и активность фермента 11 β -ГСД в печени не отличались от величин этих показателей у контрольных крыс.

Заключение

Проведенное исследование показало, что хроническое гранулематозное воспаление, индуцированное введением диоксида кремния, сопровождается у крыс начальной кратковременной реакцией активации синтеза кортикостерона с последующим специфическим ингибированием как его синтеза, так и превращения 11ДГКС в кортикостерон в надпочечниках, особенно выраженных на 14 сутки эксперимента. Значимость таких изменений заключается в том, что формирование полноценного ответа со стороны иммунной системы на введение диоксида кремния в качестве индуктора воспаления и образование большого числа гранул возможны лишь в условиях пониженной глюкокортикоидной функции коры надпочечников. В этот же период активного формирования гранул (14 суток) наблюдается увеличение активности 11 β -ГСД-I в печени и понижение активности 11 β -ГСД-II в почках, что способствует сохранению концентрации кортикостерона

в крови и в печени на уровне контрольных животных при снижении его синтеза в надпочечниках. Таким образом, хроническое гранулематозное воспаление, индуцированное введением диоксида кремния, оказывает модулирующее влияние на активность как надпочечникового, так и вненадпочечникового образования основного глюкокортикоидного гормона кортикостерона у крыс.

Список литературы

1. Макарова О.П., Саперова М.А., Шкурूपий В.А. Перекисное окисление липидов в печени и легких при SiO₂-гранулематозе // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2010. – Т. 149, № 6. – С. 640–643.
2. Новикова М.С., Потапова О.В., Шкурूपий В.А. Цитоморфологическое исследование развития фибротических осложнений при хроническом SiO₂-гранулематозе в печени под воздействием радона // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 250–253.
3. Селятицкая В.Г., Пальчикова Н.А., Шкурूपий В.А. Функциональное состояние коры надпочечников у мышей оппозитных линий в динамике кандидоза // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2005. – Т. 140. – № 9. – С. 179–281.
4. Черкасова О.П. Активность 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы печени и почек крыс при наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензии // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, вып. 6. – С. 568–575.
5. Черкасова О.П., Федоров В.И. Одновременное исследование содержания кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в надпочечниках и плазме крови intactных крыс и при остром стрессе // Проблемы эндокринологии. – 2001. – № 1. – С. 37–39.
6. Черкасова О.П., Селятицкая В.Г. Кортикостероидные гормоны и ангиотензинпревращающий фермент в динамике хронического гранулематозного воспаления // Пат. физиол. эксперим. терапия. – 2013. – № 2. – С. 26–31.
7. Шварц Я.Ш., Зубахин А.А., Устинов А.С. и др. (2000) Бюл. эксперим. биол. мед. – 2000. – Т. 129, № 1. – С. 20–24.
8. Basu R., Singh R.J., Basu A. et al. Splanchnic cortisol production occurs in humans: evidence for conversion of cortisone to cortisol via the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-hsd) type 1 pathway // Diabetes. – 2004. – V. 53, № 8. – P. 2051–2059.
9. Palchikova N.A., Kuzminova O.I., Utkina N.V. et al. Content of Steroid Hormones in the Blood and Adrenal Glands of Mice in the Dynamics of BCG- and SiO₂-Induced Granulomatous Inflammation // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – Vol. 146, № 6. – P. 705–707.
10. Shkurupiy V.A., Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G. et al. Silica inflammation modulates lipoperoxide and thiobarbituric acid reactive substances levels in liver and glucose concentration in blood of alloxan diabetic rats // 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 19–25.