

# ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

## ГЕНОМНЫЕ И ЭКСТРАГЕНОМНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО ЭФФЕКТА ГЕСТАГЕНОВ НА ТИМОЦИТЫ

А. В. Семейкин, А. С. Духанин, Р. В. Самойликов,  
В. М. Ржезников, Н. Л. Шимановский<sup>1</sup>

Оценивали влияние нового синтетического производного прогестерона 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (АБМП) и гестагенных препаратов сравнения на тимус крыс по степени изменения внутриклеточного уровня Са, цАМФ, включение <sup>3</sup>Н-уридина в РНК и жизнеспособность тимоцитов, а также массы тимуса. Показана способность гестагенов оказывать антиглюкокортикоидные эффекты в тимоцитах, наиболее выраженная у АБМП.

**Ключевые слова:** 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он, гестагены, дексаметазон, тимоциты

### ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих работах показана гестагенная активность у нового стероидного соединения 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (АБМП, бутагест) и перспективность применения его в качестве противоопухолевого препарата, а также средства, повышающего противоопухолевое действие цитостатиков [1, 2].

Однако для обоснованной рекомендации клинического применения необходимо изучить весь спектр фармакологической активности АБМП, который может складываться не только из собственно гестагенного эффекта, но и быть обусловлен наличием или отсутствием андрогенной, антиандрогенной, антимицералокортикоидной и глюкокортикоидной активности. Так, присутствие в спектре фармакологического действия того или иного гестагена глюкокортикоидной активности может привести к развитию побочного иммунодепрессивного действия гестагена.

Наиболее типичным примером глюкокортикоидного эффекта является апоптоз лимфоцитов тимуса, индуцируемый глюкокортикоидами (ГК). Именно поэтому в нашей работе для оценки возможной анти- или глюкокортикоидной активности нового синтетического гестагена АБМП в качестве объекта исследования использованы тимоциты крысы. Изучали ранние (первые 30 мин) эффекты стероидов — влияние на внутриклеточный уровень вторичных мессенджеров цАМФ и ионов кальция, а также поздние (6 ч) стадии апоптоза лимфоцитов тимуса (вторая отсроченная фаза Са-отве-

та, влияние на синтез РНК и жизнеспособность клеток).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Исследование влияния АБМП на тимус крыс*

Исследования проводили на половозрелых белых крысах-самках, со средней массой 200 г, содержащихся на стандартной лабораторной диете. Крысы были разделены случайным образом на 3 группы по 5 животных. Первая группа получала АБМП в дозе 5 мг/кг, вторая группа получала АБМП в дозе 10 мг/кг, третья группа (контрольная) — растительное (оливковое) масло. Животные получали растворенный в растительном масле бутагест внутрь в течение 10 дней. У животных регистрировали массу тела и тимуса.

#### *Приготовление суспензии тимоцитов*

Исследование проводили на половозрелых белых крысах самках массой 120 – 150 г. После декапитации крыс под эфирным наркозом немедленно извлекали тимусы и помещали в бюкс с культуральной средой (рН 7,35 при  $t = 20^\circ\text{C}$ ), ткань органа разрезали ножницами на мелкие кусочки, помещали в слабо притертый гомогенизатор и поступательными движениями пестика выдавливали тимоциты до полного опустошения стромы. Полученную суспензию фильтровали через капроновую сетку и центрифугировали три раза при 800 g в течение 10 мин.

#### *Оценка жизнеспособности клеток*

Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом витального окрашивания клеток трипановым синим. В отношении 1:1 суспензию клеток смешивали с 0,2 % раствором трипанового синего, приготовленного на НЕРЕС-буфере, и через 40 с микроскопировали. Жизнеспособность оценивали по процентному соот-

<sup>1</sup> Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии МБФ (зав. — акад. РАМН, П. В. Сергеев) РГМУ, Москва, 117437, ул. Островитянова, 1.

ношению неокрашенных клеток к общему числу клеток.

*Определение внутриклеточного уровня цАМФ.*

Для определения содержания цАМФ использовали стандартный набор реактивов фирмы “Amersham” (Великобритания).

*Определение включения меченого уридина в РНК-преципитат тимоцитов.*

К 0,5 мл клеточной суспензии тимоцитов (5 млн клеток в 1 мл среды 199) добавляли 20 мкл раствора гормона, после чего клетки инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 ч. В контрольных пробах клетки инкубировали без стероида. Через 3 ч в каждую пробирку вносили по 1 мкКи <sup>3</sup>Н-уридина ВО “Изотоп” в объеме 10 мкл. Пробы инкубировали еще 1 ч, затем пробирки охлаждали до 40 °С и центрифугировали (3000 g, 10 мин). К осадку добавляли 3 мл 5 % раствора предварительно охлажденной до 40 °С трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образующийся в результате материал (осаждаемый ТХУ) состоит из преципитированной <sup>3</sup>Н-уридин-РНК. Полученный после центрифугирования осадок переносили во флаконы для определения содержания меченого уридина методом жидкостной радиометрии.

*Определение внутриклеточной концентрации ионов Са.*

Для определения внутриклеточной концентрации ионов Са использовали зонд Fura-2 [3]. Полученную суспензию клеток (10 – 15 · 10<sup>5</sup> кл/мл) инкубировали с FURA-2/AM, “Sigma”, (конечная концентрация 5 мкМ) при 20 °С в течение 40 мин. Не включившийся индикатор отделяли, дважды отмывая клетки свежим Кребс-буфером, перед определением флуоресценции тимоциты переводили в HEPES-буфер следующего состава (мМ): 145 NaCl, 5 KCl, 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0,5 MgSO<sub>4</sub>, 5 глюкоза, 10 NaHEPES, pH 7,4 при 37 °С.

Пробы объемом 1 мл помещали в ячейку спектрофлуориметра MPF-4 “Hitachi” и регистрировали флуоресценцию (500 нм) при длинах возбуждающего света 340 и 380 нм, соответствующих максимуму поглощения связанной с ионами и свободной формы зонда FURA-2. Для подсчета количества клеток использовали камеру Горяева, жизнеспособность тимоцитов оценивали по исключению трипанового синего (85 – 90 % жизнеспособных клеток на начало экспериментов).

Внутриклеточную концентрацию кальция рассчитывали на основании измерений при двух длинах волн возбуждения (F340 и F380) по формуле:

$$(\text{Ca}^{2+})_{\text{цит}} = K_d \cdot k \cdot (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R),$$

где  $R$  — регистрируемый уровень флуоресценции. Значение  $K_{\text{дисс}}$  — равновесной константы диссоциации Fura-2 с  $\text{Ca}^{2+}$  — определяли в модельных опытах, используя раствор Fura-2. Рассчитанная с помощью анализа Скетчарда величина  $K_{\text{дисс}}$  составила 140 нМ.

Для определения  $R_{\text{max}}$  плазматическую мембрану тимоцитов, содержащихся в среде с насыщающей для FURA концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (более 1000 Kd), разрушали 40 мкМ дигитонином, разрушающим мембрану с высоким содержанием холестерина, каковой является плазматическая мембрана клетки (в отличие от мембраны внутриклеточных органелл).  $R_{\text{min}}$  определяли, добавляя после этого 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, который вытесняет  $\text{Ca}^{2+}$  из комплекса с красителем. В нашем случае F340 — интенсивность флуоресценции, регистрируемая при 500 нм, длина волны возбуждения 340 нм, F380 — интенсивность флуоресценции, регистрируемая при 500 нм, длина волны возбуждения 380 нм;  $k$  — отношение интенсивности флуоресценции при 380 нм для свободного и связанного зонда ( $7,3 \pm 0,5$ ). Оптимальное время инкубации суспензии клеток

Таблица 1. Влияние гестагенов и дексаметазона на уровень цАМФ (пмоль/10<sup>6</sup> клеток) в тимocyтах крыс

Соединение	Продолжительность инкубации, мин			
	10	15	20	30
Дексаметазон				
5 · 10 <sup>-7</sup> М	4,2 ± 0,4	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,3
1 · 10 <sup>-6</sup> М	4,6 ± 0,2	4,9 ± 0,3*	5,6 ± 0,3*	5,0 ± 0,3*
5 · 10 <sup>-6</sup> М	4,9 ± 0,2*	7,9 ± 0,4*	6,8 ± 0,3*	6,4 ± 0,3*
Прогестерон				
5 · 10 <sup>-6</sup> М	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,3
МПА				
5 · 10 <sup>-6</sup> М	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,2
АБМП				
5 · 10 <sup>-6</sup> М	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,4	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,3
Мецигестон				
5 · 10 <sup>-6</sup> М	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,1 ± 0,3
Контроль без гормона	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,3

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 – 4: \* — отличие от контроля достоверно при  $p \leq 0,05$

( $10 - 15 \cdot 10^5$  кл/мл) с FURA-2/AM (конечная концентрация 5 мкМ) было определено в контрольных экспериментах

Для статистической обработки данных был использован *t*-критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов изучали влияние нового гестагена АБМП и препаратов сравнения (прогестерон, медроксипрогестерона ацетат — МПА, мецигестон) на негеномные мембранотропные эффекты дексаметазона, которые включали гормонзависимое повышение базального уровня цАМФ (табл. 1 и 2) и влияние на базальный уровень свободных ионов кальция (табл. 3). К отличительным признакам экстраядерных механизмов действия дексаметазона относятся: отсутствие латентного периода, быстрота наступления эффекта (в пределах первых 30 мин), резистентность по отношению к действию ингибиторов синтеза белка и РНК, обратимость действия (после удаления дексаметазона из среды инкубации эффекты не регистрируются) [4, 5]. Негеномные мембранотропные эффекты дексаметазона опосредованы мембранными глюкокортикоидными рецепторами тимоцитов [6, 7].

Исследуемые соединения в изученном диапазоне концентраций (0,5 – 5 мкМ) не изменяли базальный уровень цАМФ в тимоцитах (в табл. 1 приведены результаты исследований для АБМП и препаратов сравнения в максимальной концентрации). В то же время совместное применение дексаметазона и изучаемых соединений позволило установить наличие антиглюкокортикоидного эффекта (табл. 2). Оценку антиглюкокортикоидного действия гестагенов проводили на 20-й минуте инкубации — временная точка максимального проявления действия дексаметазона, определенная на основе данных, представленных в табл. 1.

Сочетание гестагена и дексаметазона снижало уровень цАМФ на 12,5 – 21,4 % от контрольных значений в зависимости от природы гестагена. Следовательно, при совместной инкубации глюкокортикоидов и гестагенов с тимоцитами гестагены подавляли дексамезон-индуцированное повышение цАМФ. Наиболее

выраженным эффектом из исследуемых гестагенов обладали прогестерон и АБМП.

Сходное влияние гестагенов на проявление раннего негеномного действия дексаметазона на тимоциты обнаружено при исследовании изменений базального внутриклеточного уровня свободных ионов кальция (табл. 3). В интактных клетках концентрация цитозольного кальция составляла  $98 \pm 7$  нМ. Добавление дексаметазона (1 – 10 мкМ) приводило к увеличению уровня кальция, эффект имеет дозо-зависимый характер (данные не приведены). Конечная концентрация гестагенов (5 мкМ) была выбрана с таким расчетом, чтобы имела место их конкуренция с дексаметазоном (1 мкМ).

Показано снижение уровня внутриклеточного Са при инкубации глюкокортикоида с АБМП в среднем на 18,5 % от контроля, с прогестероном на 17,7 % от контроля. Менее выраженное влияние оказывали мецигестон и МПА — 11,1 % от контроля.

Основываясь на представленных результатах можно сделать заключение, что АБМП и другие гестагены самостоятельно не оказывают влияния на уровень цАМФ и уровень внутриклеточного Са в тимоцитах. Однако при их применении совместно с дексаметазоном гестагены способны снижать индуцируемое дексаметазоном повышение уровня цАМФ и внутриклеточного Са. Максимально эта способность выражена у АБМП и прогестерона.

Показано, что достоверным влиянием на уровень внутриклеточного Са обладают только прогестерон и МПА (данные не приведены).

Во второй серии экспериментов изучали геном-опосредованный эффект дексаметазона на тимоциты — ингибирование включения  $^3\text{H}$ -уридина в РНК — в отсутствие и присутствии гестагенов. Ингибирование включения меченого предшественника под действием глюкокортикоида характеризуется лаг-периодом (1 – 2 ч), опосредовано внутриклеточными глюкокортикоидными рецепторами. ГК необходим на этапе инициации геномного эффекта, далее его присутствие не является обязательным [8]. В зависимости от концентрации (0,5 – 5 мкМ) дексамезон ингибировал включение  $^3\text{H}$ -уридина в среднем на 44 – 71 %. В отсутствие глюкокортикоида ингибирующее действие на включение  $^3\text{H}$ -уридина оказывали: прогестерон в максимальной взятой концентрации 5 мкМ — на 14 и МПА

Таблица 2. Влияние гестагенов на уровень цАМФ (пмоль/ $10^6$  кл.) тимоцитов крыс при совместной инкубации с дексаметазоном (1 мкМ)

Соединение	Уровень цАМФ на 20-й минуте инкубации
Прогестерон (5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$4,4 \pm 0,3^*$
МПА(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$4,9 \pm 0,3^*$
АБМП(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$4,7 \pm 0,3^*$
Мецигестон(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$4,9 \pm 0,3^*$
Контроль с дексаметазоном	$5,6 \pm 0,3$

Таблица 3. Влияние гестагенов на уровень Са (в нМ) в тимоцитах при их совместной инкубации с дексаметазоном (1 мкМ) в течение 30 мин

Соединение	Уровень Са
Прогестерон (5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$111 \pm 12^*$
МПА(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$120 \pm 12^*$
АБМП(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$110 \pm 11^*$
Мецигестон(5 мкМ) + дексамезон (1 мкМ)	$120 \pm 13^*$
Контроль с дексаметазоном (1 мкМ)	$135 \pm 11^*$

Таблица 4. Жизнеспособность тимоцитов при совместной инкубации гестагенов с дексаметазоном (2 мкМ)

Соединение	Жизнеспособность, %
Прогестерон (5 мкМ) + дексаметазон (2 мкМ)	40 ± 5
МПА (5 мкМ) + дексаметазон (1 мкМ)	44 ± 5
АБМП (5 мкМ) + дексаметазон (1 мкМ)	61 ± 4*
Мецигестон (5 мкМ) + дексаметазон (1 мкМ)	48 ± 9
Контроль с дексаметазоном (2 мкМ)	42 ± 7

— на 19 %. Совместное применение дексаметазона (1 мкМ) и гестагенов (5 мкМ) показало, что АБМП снижал ингибирующий эффект дексаметазона на 36 % по отношению к контролю с дексаметазоном. Другие исследуемые гестагены в сочетании с дексаметазоном достоверной способности влиять на включение <sup>3</sup>H-уридина не показали.

В заключительной серии опытов изучено влияние гестагенов на смешанные эффекты глюкокортикоидов — влияние на жизнеспособность тимоцитов (оценивалось в условиях *in vitro*), позднюю фазу Са-ответа на ГК (0,5 – 2,5 ч после начала воздействия).

Экспериментально показано, что у АБМП и других соединений нет самостоятельного глюкокортикоидного эффекта. Об отсутствии собственной глюкокортикоидной активности у АБМП также свидетельствуют данные о неизменности массы тимуса крыс при 10-суточном введении им АБМП внутрь.

В то же время при совместной инкубации дексаметазона с гестагенами между АБМП и другими препаратами сравнения обнаружены различия в их способности влиять на тимолитическую активность дексаметазона (табл. 4).

Оказалось, что АБМП повышал выживаемость тимоцитов на 45,2 % по отношению к контролю с дексаметазоном. Другие исследуемые гестагены влияния на выживаемость при совместном применении с глюкокортикоидом не оказывали.

Анализируя представленные данные, можно заключить, что все исследуемые гестагены обладают свойствами антагонистов мембранных рецепторов глюкокортикоидов, т.к. способны подавлять быстрые негеномные эффекты дексаметазона на внутриклеточный

уровень цАМФ и Са. Эти свойства наиболее выражены у АБМП и прогестерона. Антиглюкокортикоидную активность в отношении геномного (включение <sup>3</sup>H-уридина) и смешанных эффектов дексаметазона проявил только АБМП, что указывает на необходимость дальнейшего изучения возможного клинического значения этого эффекта у нового гестагена АБМП.

## ВЫВОДЫ

1. Новое гестагенное соединение АБМП не влияет на базальный уровень цАМФ, внутриклеточного Са, метаболическую активность и выживаемость тимоцитов.

2. АБМП при сочетании с дексаметазоном снижает его геномные и экстрагеномные эффекты на тимоциты (уровень цАМФ, внутриклеточного Са, выживаемость и метаболическая активность). Прогестерон, МПА, мецигестон снижают только экстрагеномные эффекты дексаметазона (уровень цАМФ и внутриклеточного Са). Максимальными внегеномными эффектами обладают прогестерон и АБМП.

3. АБМП обладает антиглюкокортикоидным эффектом, проявляющимся в снижении цитотоксичности дексаметазона на тимоциты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Сергеев, П. А. Галенко-Ярошевский, Н. Л. Шимановский, *Очерки биохимической фармакологии*, Москва. (1996 г.).
2. П. В. Сергеев, А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева и др., *Бюл. экпер. биол.*, **136**(11) 519 – 522 (2003).
3. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 – 63 (1983).
4. M. Wehling, J. Kasmayr, and K. Theisen, *Am. J. Physiol.*, **260**(5 Pt 1), E719 – E726.
5. G. P. Leung, S. B. Cheng-Chew, and P. Y. Wong., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **280**(5), C1160 – C1167 (2001).
6. S. B. Koukouritaki, P. A. Theodoropoulos, A. N. Margioris, et al., *J. Cell. Biochem*, Aug; **62**(2); 251 – 61 (1996).
7. G. P. H. Leung, S. B. Cheng-Chew, and P. Y. D. Wong, *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, **280**, C1160 — C1167, 0363 – 6143/01 (2001).
8. T. Simoncini, P. Mannella, L. Fornari, et al., *Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. Steroids. Aug.*; **69**(8 – 9), 537 – 542 (2004).

Поступила 02.11.05

## GENOMIC AND EXTRAGENOMIC MECHANISMS OF ANTIGLUCOCORTICOID ACTION OF GESTAGENS ON THYMOCYTES

A. V. Semeikin, A. S. Dukhanin, R. V. Samoilikov, V. M. Rzheshnikov, and N. L. Shimanovskii

State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117437 Russia

Effects of a new synthetic progesterone derivative 17 $\alpha$ -acetoxy-3 $\beta$ -butanoyloxy-6-methyl-pregna-4,6-dien-20-one (ABMP) and the reference gestagen preparations on the rat thymus were evaluated by the degree of variation of the intracellular levels of calcium and cAMP, <sup>3</sup>H-uridine inclusion into RNA, thymocyte viability, and thymus mass. It is shown that gestagens can produce antiglucocorticoid action on thymocytes, this activity being most pronounced in the case of ABMP.