

УДК 616.154:577.175.53

©Черкасова

АКТИВНОСТЬ 11 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК КРЫС ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

О.П. Черкасова

Институт лазерной физики СО РАН, 630090, Новосибирск,
пр-т Академика Лаврентьева 13/3; тел.: (3832)-309922; факс: (3832)-305218;
эл. почта: chrom@laser.nsc.ru

11 β -гидроксистероиддегидрогеназа (11 β -ГСД) – ключевой фермент пререцепторного метаболизма глюкокортикоидных гормонов, который осуществляет взаимопревращение кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона у крыс. Активность 11 β -ГСД в почках крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией (линия НИСАГ) в 1,5 раза выше таковой у крыс линии WAG. В печени наблюдается обратная зависимость. При стрессе не наблюдается изменения активности 11 β -ГСД в почках крыс обеих линий, но достоверно повышается активность фермента в печени крыс линии НИСАГ. Эти особенности функционирования 11 β -ГСД могут быть отражением гипертензивного статуса крыс линии НИСАГ.

Ключевые слова: 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа, стресс-чувствительная артериальная гипертония, кортикостерон, 11-дегидрокортикостерон, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ. 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа (11 β -ГСД, КФ 1.1.1.146) – ключевой фермент пререцепторного метаболизма глюкокортикоидных гормонов, который осуществляет взаимопревращение кортизола и кортизона в организме человека и кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона у крыс.

Обнаружено несколько изоформ данного фермента. Первая изоформа (11 β -ГСД1) использует в качестве кофактора NADP/NADPH, имеет значения константы Михаэлиса в микромолярном диапазоне и локализована в эндоплазматической сети и на ядерной мембране [1]. Эта изоформа фермента обнаружена в печени, почках, жировой ткани, различных отделах головного мозга и других тканях. *In vivo* 11 β -ГСД1 катализирует преимущественно реакцию восстановления кортизона и 11-дегидрокортикостерона в кортизол и кортикостерон и играет важную роль в поддержании высоких уровней активных глюкокортикоидов в пределах клетки, даже в случаях низких уровней в плазме крови, тем самым обеспечивая адекватную активизацию глюкокортикоидных рецепторов. 11 β -ГСД1 играет важную роль в функционировании печени,

в развитии стрессорной реакции, регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы [2]. Нарушение активности данной формы фермента связано с такими заболеваниями как диабет второго типа, ожирение, нарушение мозговых функций [3, 4].

Вторая изоформа фермента (11 β -ГСД2) локализована с рецепторами минералокортикоидных гормонов и обнаружена в классических тканях-мишенях альдостерона (почки, кишечник, потовые железы, сосуды и др.) [5]. 11 β -ГСД2 является высокоаффинной NAD-зависимой дегидрогеназой и катализирует реакцию окисления, превращая кортизол и кортикостерон в кортизон и 11-дегидрокортикостерон, тем самым предотвращая связывание глюкокортикоидов с минералокортикоидным рецептором. Эта изоформа фермента обнаружена как в эндоплазматической сети, так и в ядрах [6]. Нарушение активности этой изоформы фермента в почках приводит к возникновению и развитию различных видов гипертензии, синдрому видимого избытка минералокортикоидов, при котором происходит удержание натрия, гипокалиемия, а уровни альдостерона, ренина плазмы крови и ангиотензина II остаются в норме [7].

При анализе активности 11 β -ГСД в линиях крыс с различным типом гипертензии было обнаружено уменьшение активности 11 β -ГСД2 в почках крыс со спонтанной артериальной гипертензией (линия SHR) [8, 9] и уменьшение активности 11 β -ГСД1 в печени других линий гипертензивных крыс [10, 11]. Артериальное давление у крыс этих линий повышается спонтанно и мало зависит от факторов среды. Представляло интерес исследовать активность фермента при артериальной гипертензии, возникающей в условиях действия мягкого эмоционального стресса. Считают, что значительное число случаев гипертонии у человека может иметь такую природу [12]. Для изучения влияния эмоционального стресса на развитие гипертензии в Институте цитологии и генетики СО РАН была получена инбредная линия крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией (линия НИСАГ) [13]. Цель работы состояла в сравнительном анализе активности 11 β -ГСД в печени и почках крыс линии НИСАГ и нормотензивных крыс линии WAG. Такие исследования ранее не проводились.

МЕТОДИКА. Эксперименты выполнены на взрослых (5-6 мес) крысах-самцах двух инбредных линий - нормотензивной линии WAG и гипертензивной стресс-чувствительной линии НИСАГ, содержащихся в условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Стресс создавали путем помещения крыс на 2 часа в проволочные клетки-цилиндры, соответствующие размерам тела животного. Сразу же после стресса производили декапитацию с последующим быстрым взятием крови и тканей.

Корковый слой почки и кусочки печени весом 40-50 мг взвешивали на торсионных весах и обрабатывали следующим образом: помещали в охлажденный стеклянный гомогенизатор, приливали 1 мл 20 мМ трис-HCl буфера, pH 8,3, содержащего 5 мМ Mg(CH₃COO)₂, 30 мМ KCl, 250 мМ сахарозы и 0,5% тритона X-100, тщательно перетирали. Затем центрифугировали при 3000 g 15 мин при 4°C. Супернатант отбирали и использовали в дальнейшем анализе.

Определение активности 11 β -ГСД в гомогенатах тканей проводили, используя собственный метод. Принцип определения активности 11 β -ГСД состоял в следующем: инкубация гомогената ткани в присутствии кофактора с субстратом, который окисляется до продукта, затем хроматографическое разделение субстрата и продукта реакции и расчет активности фермента по количеству образованного продукта. Инкубацию каждого гомогената проводили дважды. Дегидрогеназную активность 11 β -ГСД в почках определяли следующим образом: 100 мкл гомогената инкубировали 60 мин при 37°C в присутствии 0,2 мкМ кортикостерона, 1,5 мМ NADP в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 8,5.

Дегидрогеназную активность 11 β -ГСД в гомогенатах печени определяли, инкубируя 10 мкл гомогената 15 мин при 37°C в присутствии 1,5 мМ NADP в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 8,5 с 30 мкМ кортикостерона. Реакцию останавливали

добавлением 100 мкл ацетонитрила. В качестве внутреннего стандарта добавляли 10 мкл 0,25 мМ ацетата кортизона. Затем инкубационную смесь центрифугировали и 10 мкл супернатанта анализировали при помощи микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе “Милихром-1” (НПО “Научприбор”, Россия), оснащенный аналитической колонкой размером 62×2 мм (Силасорб C₁₈, 5 мкм). В качестве элюента использовали градиент ацетонитрила в воде от 30 до 45%. Использовали длину волны детектирования 240 нм. Активность фермента выражали в нмоль 11-дегидрокортикостерона, образованного за 1 минуту в 1 грамме ткани (нмоль•мин⁻¹•г⁻¹).

Редуктазную активность 11β-ГСД в гомогенатах печени определяли следующим образом: к 50 мкл 5 мМ NADPH в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 6,8 добавляли 10 мкл 0,35 мМ раствора 11-дегидрокортикостерона в этиловом спирте, перемешивали. Затем приливали 100 мкл гомогената печени, осторожно перемешивали и инкубировали 60 мин при 37°C. Дальнейшую обработку проводили, как описано выше. Активность выражали в нмоль кортикостерона, образованного за 1 минуту в пересчёте на 1 грамм ткани (нмоль•мин⁻¹•г⁻¹).

Кортикостерон и 11-дегидрокортикостерон в плазме крови крыс определяли по методу [14]: 0,5 мл плазмы крови крысы экстрагировали 4 мл гексана, органический слой отбрасывали. Затем к водной фазе приливали 9 мл хлороформа, экстрагировали 5 мин, органический слой упаривали досуха.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica. Данные представлены как средняя ± ошибка средней. Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В интактном состоянии не наблюдается достоверных различий по содержанию кортикостерона в плазме крови крыс обеих линий. Содержание кортикостерона в плазме крови крыс линии НИСАГ в среднем в 1,4 раза ниже, чем у крыс линии WAG и составляет 46±13 и 66±15 нг/мл, соответственно. При стрессе происходит достоверное увеличение кортикостерона как у крыс линии WAG (до 159±33 нг/мл), так и у крыс линии НИСАГ (до 250±39 нг/мл), причем у крыс линии НИСАГ уровень кортикостерона в плазме крови становится достоверно выше, чем у крыс линии WAG ($p < 0,05$). По содержанию 11-дегидрокортикостерона в плазме крови достоверных отличий между линиями не наблюдается как в интактном состоянии (20±8 нг/мл, линия WAG и 17±4 нг/мл, линия НИСАГ), так и при стрессе (24±5 нг/мл, линия WAG и 21±2 нг/мл, линия НИСАГ). Полученные значения совпадают с данными статьи [9].

Отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в плазме крови у интактных крыс линии WAG составляет 5,05±1,05, что совпадает с данными, сообщенными в статье [15]. Отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон у крыс линии НИСАГ по сравнению с крысами линии WAG достоверно ниже и составляет 2,90±0,63 (рис. 1). Отношение основного глюкокортикоидного гормона к его метаболиту отражает функциональное состояние глюкокортикоидной системы и может служить показателем оценки активности системной 11β-ГСД [16]. В клинической практике используется коэффициент кортизол/кортизон для анализа активности 11β-ГСД как в интактном состоянии [14, 17], так и при использовании ингибиторов фермента [18]. Считают, что отношение кортизол/кортизон в крови является неинвазивным инструментом для анализа активности 11β-ГСД *in vivo* [18]. Уменьшение этого соотношения можно объяснить сниженной активностью 11-ГСД1, увеличенной активностью 11β-ГСД2, либо комбинацией двух этих факторов [19]. Ранее нами обнаружено, что при патологии почек и печени происходит изменение баланса глюкокортикоидных гормонов в крови человека [20]. Рядом авторов обнаружена корреляция между отношением гормонов в крови и активностью 11β-ГСД почки у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) [9], больных диабетом и хронической почечной недостаточностью [7, 16].

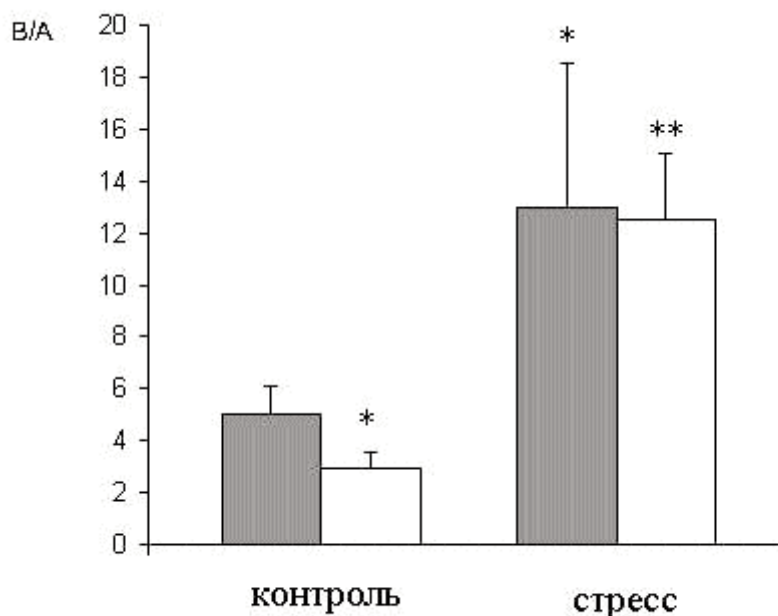


Рисунок 1.

Отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон (В/А) в плазме крови. Темные столбцы – крысы линии WAG (n=6 для каждого состояния), светлые – крысы линии НИСАГ (n=6 для каждого состояния). * - достоверные отличия относительно контрольных крыс линии WAG ($p<0,05$); ** - достоверные отличия относительно контрольных крыс линии НИСАГ ($p<0,05$);

При стрессе происходит достоверное увеличение отношения кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в крови как у крыс линии НИСАГ, так и у крыс линии WAG (рис. 1).

В почках крыс обнаружены обе изоформы фермента [1]. Инкубация гомогената коры почки в присутствии NADP выявляет в 4 раза большую активность фермента. Такие же закономерности были обнаружены рядом авторов [9, 11]. Поэтому для дальнейшей работы использовали инкубацию в присутствии именно этого кофактора. Низкое отношение кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в крови крыс линии НИСАГ согласуется с нашими данными по активности 11 β -ГСД в почках крыс. Оказалось, что в интактном состоянии активность 11 β -ГСД в почках крыс линии НИСАГ в 1,5 раза выше таковой у крыс линии WAG (рис. 2). При стрессе активность 11 β -ГСД у крыс линии WAG несколько увеличивается и практически не изменяется у крыс линии НИСАГ, оставаясь достоверно более высокой. Следует отметить, что активность 11 β -ГСД у крыс линии НИСАГ находится на достаточно высоком уровне и стресс, несмотря на возрастание кортикостерона в крови в несколько раз, практически не влияет на активность фермента в почках (рис. 2).

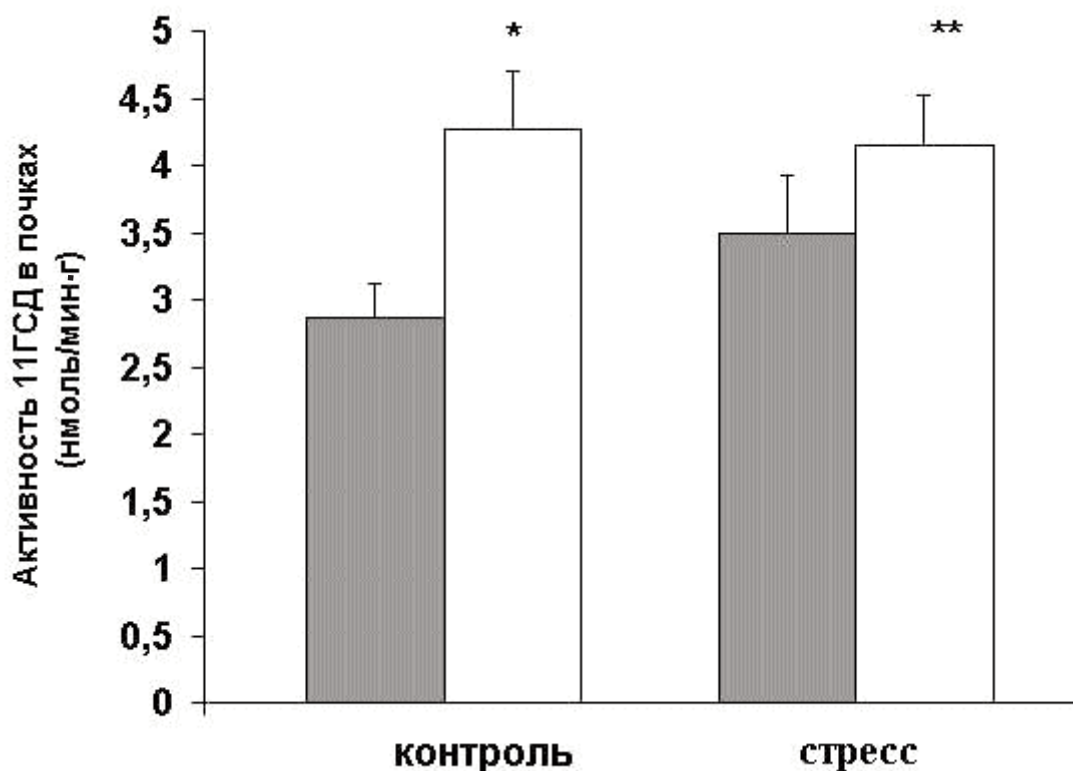


Рисунок 2.

Активность 11β-ГСД в почках. * - достоверные отличия относительно контрольных крыс линии WAG ($p < 0,05$); ** - достоверные отличия относительно стрессированных крыс линии WAG ($p < 0,05$); остальные обозначения, как на рисунке 1.

11β-ГСД1 в культуре клеток гепатоцитов крысы катализирует преимущественно реакцию восстановления 11-дегидрокортикостерона в кортикостерон [21]. Считают, что направление реакции зависит от доступности кофакторов NADP/NADPH, которое может отличаться в разных тканях и культурах тканей [3, 22, 23]. 11β-ГСД1 расположена на люминальной поверхности мембраны эндоплазматической сети по соседству с ферментами, генерирующими NADPH, в частности, с гексозо-6-фосфатдегидрогеназой. Считают, что активность данного фермента является ключевой при определении преимущественного направления реакции 11β-ГСД1 [24]. При выделении фермента из клеток направление реакции изменяется. В гомогенатах печени 11β-ГСД1 проявляет преимущественно дегидрогеназную активность, которая активизируется в присутствии NADP и имеет оптимум реакции в щелочной области [3]. Именно по определению дегидрогеназной активности судят об уровне активности 11β-ГСД1 в гомогенатах печени и других тканей [9, 11].

Дегидрогеназная активность 11β-ГСД в печени крыс линии НИСАГ в 1,5 раза ниже таковой у крыс линии WAG (рис. 3). Это согласуется с низким отношением кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в крови крыс линии НИСАГ. Значения активности фермента в печени совпадают с литературными данными [9]. Известно, что 11β-ГСД1 в печени важна для активизации ключевых ферментов глюконеогенеза [1, 3]. Уменьшение активности 11β-ГСД в печени ведет к ослаблению активности этих ферментов и является одной из причин развития диабета. При стрессе активность 11β-ГСД практически не изменяется у крыс линии WAG, а у крыс линии НИСАГ достоверно увеличивается, что совпадает с достоверным увеличением отношения кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в крови.

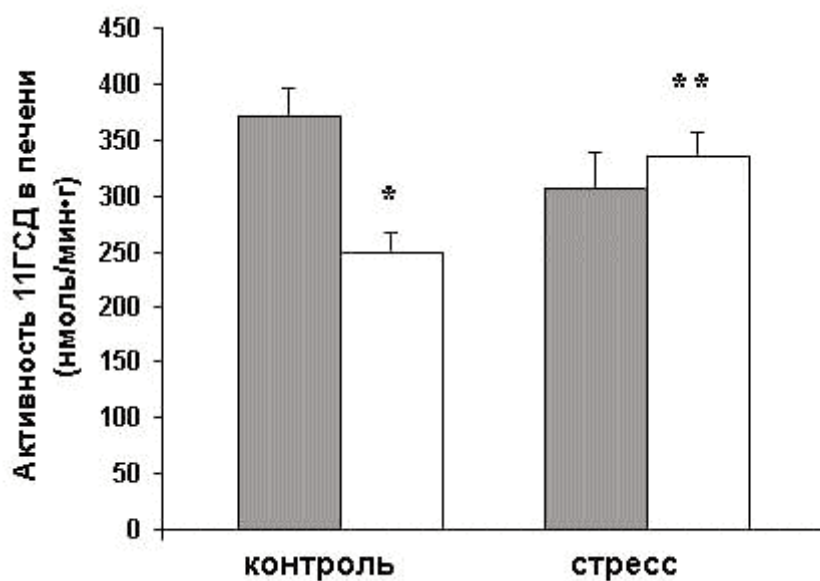


Рисунок 3.

Активность 11 β -ГСД в печени. Обозначения, как на рисунке 1.

Редуктазная активность 11 β -ГСД1 в гомогенатах тканей не стабильна и регистрируется на низком уровне [25]. Нами обнаружена незначительная редуктазная активность первой изоформы фермента в гомогенатах печени крысы. По уровню этой активности в интактном состоянии не наблюдается различия между линиями крыс, а при стрессе активность фермента у крыс линии НИСАГ достоверно увеличивается (рис. 4).

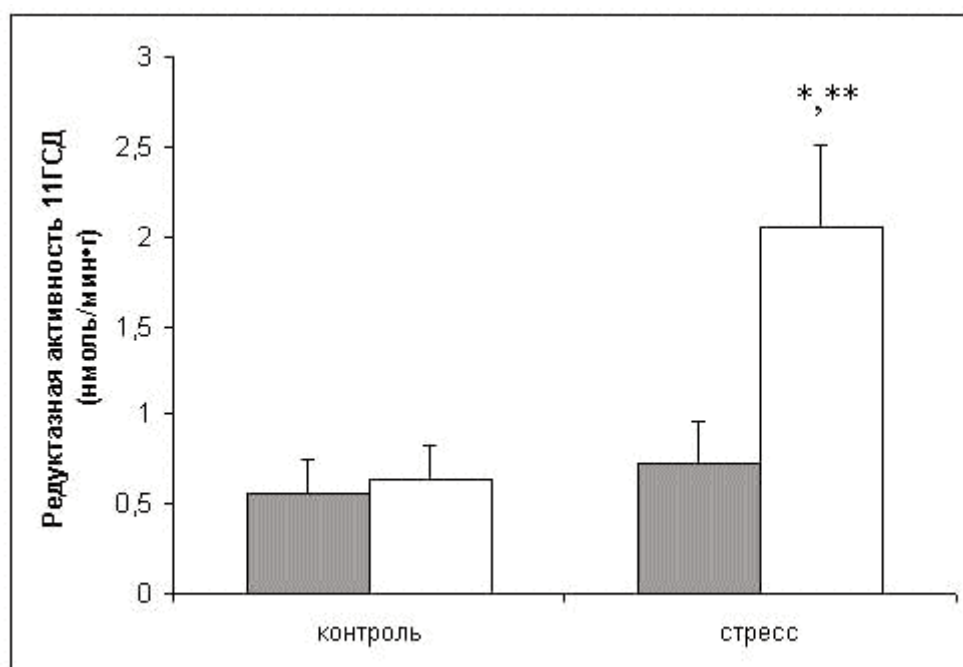


Рисунок 4.

Редуктазная активность 11 β -ГСД в печени. * - достоверные отличия относительно контрольных крыс линии НИСАГ ($p < 0,05$); ** - достоверные отличия относительно стрессированных крыс линии WAG ($p < 0,05$); остальные обозначения, как на рисунке 1.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было обнаружено, что взрослые крысы с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией имеют достоверно высокий уровень активности 11 β -ГСД в почках и низкий уровень активности фермента в печени. Это находит отражение в достоверно низком отношении кортикостерон/11-дегидрокортикостерон в плазме крови таких животных. При стрессе активность фермента в почках не изменяется, а в печени достоверно увеличивается. Эти особенности функционирования фермента являются отражением гипертензивного статуса крыс линии НИСАГ и требуют дальнейшего исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-04-48567).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brereton P.S., Driel R.R., Suhaimi F.B.H., Koyama K., Dilley R., Krozowski Z.* (2001) *Endocrinology*, **142**, 1644-1651.
2. *Harris H.J., Kotelevtsev Y., Mullins J.J., Seckl J.R., Holmes M.C.* (2001) *Endocrinology*, **142**, 114-120.
3. *Seckl J.R., Walker B.R.* (2001) *Endocrinology*, **142**, 1371-1376.
4. *Walker B.R.*, (2004) *Obes. Res.*, **12**, 1-3.
5. *Odermatt A., Arnold P., Frey F.J.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28484-28492.
6. *Kataoka S., Kudo A., Hirano H., Kawakami H., Kawano T., Higashihara E., Tanaka H., Delarue F., Sraer J-D., Mune T., Krozowski Z.S., Yan K.* (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 877-882.
7. *White P.C., Mune T., Agarwal A.K.* (1997) *Endocrine Reviews*, **18**, 135-156.
8. *Hermans J.J., Steckel B., Thijssen H.H., Janssen B.J., Netter K.J., Maser E.* (1995) *Steroids*, **60**, 773-779.
9. *Homma M., Onodera T., Hirabatake M., Oka K., Kanazawa M., Miwa T., Hayashi T.* (1998) *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 1139-1145.
10. *Stewart P.M., Whorwood C.B., Valentino R., Burt D., Sheppard M.C., Edwards C.R.W.* (1993) *J. Hypertens*, **11**, 349-354.
11. *Lloyd-MacGilp S.A., Nelson S.M., Florin M., Lo M., McKinnell J., Sassard J., Kenyon C.J.* (1999) *Hypertension*, **34**, 1123-1128.
12. *Маркель А.Л., Дымишиц Г.М., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С.* (2002) *Бюлл. СО РАМН*, №2, 35-40.
13. *Markel A.L.* (1992) *Genetic Hypertension*, **28**, 405-407.
14. *Черкасова О.П., Федоров В.И.* (2001) *Пробл. эндокринолог.*, **47**(1), 37-39.
15. *Livingstone D.E.V., Jones G.C., Smith K., Jamieson P.M., Andrew R., Kenyon C.J., Walker B.R.* (2000) *Endocrinology*, **141**, 560-563.
16. *Homma M., Tanaka A., Hino K., Takamura H., Hirano T., Oka K., Kanazawa M., Miwa T., Notoya Y., Niitsuma T., Hayashi T.* (2001) *Metab.*, **50**, 801-804.
17. *Vogeser M., Zachoval R., Felbinger T.W., Jacob K.* (2002) *Horm. Res.*, **58**, 172-175.
18. *Heilmann P., Heide J., Hundertmark S., Schyneshufer M.* (1999) *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **107**, 370-378.
19. *Toogood A.A., Taylor N.F., Shalet S.M., Monson J.P.* (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1727-1730.
20. *Федоров В.И. Черкасова О.П.* (2000) *Клин. Лаб. диагн.*, №6, 7-10.
21. *Jamieson P.M., Chapman K.E., Edwards C.R.W., Seckl J.R.* (1995) *Endocrinology*, **136**, 4754-4761.
22. *Gao H-B., Ge R-S., Lakshmi V., Marandici A., Hardy M.P.* (1997) *Endocrinology*, **138**, 156-161.

11 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

23. *Bujalska I.J., Walker E.A., Hewison M., Stewart P.M.* (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 1205-1210.
24. *Banhegyi G., Benedetti A., Fulceri R., Senesi S.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 27017-27021.
25. *Andrews R. C., Herlihy O., Livingstone D.E.V., Andrew R., Walker B.R.* (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 5587-5593.

Поступила: 26. 04. 2005.

THE ACTIVITY OF 11 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE OF RAT KIDNEY AND LIVER AT INHERITED STRESS-INDUCED ARTERIAL HYPERTENSION

O.P. Cherkasova

Institute of Laser Physics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, pr. Lavrentyeva 13/3, Russia 630090, Novosibirsk; tel.: (3832)309922; fax: (3832)305218; e-mail: chrom@laser.nsc.ru

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) is the key enzyme of glucocorticoid metabolism, which catalyzes interconversion of corticosterone and 11-dehydrocorticosterone in rat. The activity of 11 β -HSD in kidneys of rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH) was significantly ($p<0.05$) higher than that in WAG rats. The opposite was observed in the activity of liver 11 β -HSD. Under stress condition no changes in the kidney 11 β -HSD activity of both strains were observed, but the liver 11 β -HSD activity in ISIAH rats was significantly ($p<0.05$) higher as compared to basal level and stressed WAG rats. It is possible that the features of the 11 β -HSD activity in ISIAH rats may reflect the hypertensive status of ISIAH rats..

Key words: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, inherited stress-induced arterial hypertension, corticosterone, 11-dehydrocorticosterone, high-performance liquid chromatography.