

## СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕЖДУ УРОВНЕМ КОРТИКОСТЕРОНА, АКТИВНОСТЬЮ 11 $\beta$ -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ И УРОВНЕМ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СИНДРОМЕ ПОСТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОРНОГО РАССТРОЙСТВА

Лапшин М.С.<sup>1</sup>, Комелькова М.В.<sup>1,2</sup>, Цейликман О.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФАГОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национально-исследовательский университет)), Челябинск, e-mail: vadimed@yandex.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

Для выявления основного механизма снижения глюкокортикоидов при ПТСР оценивались поведенческие и химические маркеры у крыс. Мониторинг 10-дневной динамики активности HSD11 $\beta$  и цитохромов после многократного стрессирования животных запахом хищника указывает на незначительную роль фермента HSD11 $\beta$  в снижении глюкокортикоидов. Снижение уровня микросомального окисления может быть связано, в том числе и с супрессивным действием биогенных аминов на активность цитохром p450-зависимых монооксигеназ. Считается, что большую роль в динамике глюкокортикоидов играет ингибирующий эффект провоспалительных цитокинов на монооксигеназу CYP3A, которая участвует в метаболизме стероидов. Поэтому предполагается, что скорости микросомального окисления могут использоваться в качестве индикаторов ПТСР. Также обсуждается возможный вклад NO, который генерируется цитокин-зависимой индуцибельной NO-синтазой, в подавлении микросомального окисления при ПТСР.

Ключевые слова: ПТСР, 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа, цитохром p450, глюкокортикоиды.

## COMPARING CORTICOSTERONE DYNAMICS, 11 $\beta$ -DEHYDROGENASE ACTIVITY AND MICROSOMAL OXIDATION RATES IN A RAT MODEL OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

Lapshin M.S.<sup>1</sup>, Komelkova M.V.<sup>1,2</sup>, Tseilikman O.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural State University, Chelyabinsk, e-mail: vadimed@yandex.ru;

<sup>2</sup>South Ural State Medical University, Chelyabinsk

Behavioral and chemical markers were evaluated to detect the major mechanism for glucocorticoids decrease in PTSD. Monitoring the 10-days dynamics of HSD11 $\beta$  and cytochromes activities in rats after multiple exposures to predator odor stress suggests the minor role of HSD11 $\beta$  in glucocorticoids decrease. Reduction of the level of microsomal oxidation can be associated, among other things, with the suppressive action of biogenic amines on the activity of cytochromes. The inhibitory effect of pro-inflammatory cytokines to CYP3A monooxygenase involved in steroid metabolism is considered to play a major part in glucocorticoids dynamics. Therefore it's suggested that microsomal oxidation rates could be used as PTSD indicators. The NO possible contribution into microsomal oxidation suppression in PTSD is also discussed.

Keywords: PTSD, HSD11 $\beta$ , cytochrom p450, glucocorticoids.

Традиционно изучение ПТСР сфокусировано на соотношениях между изменениями поведенческой активности и нейрохимическими сдвигами в различных структурах головного мозга. При этом печени уделяется недостаточное внимание. Этот орган рассматривается всего лишь как мишень со стороны стрессорных гормонов. Между тем, будучи основной лабораторией организма, печень играет эксклюзивную роль в обеспечении головного мозга субстратами, как в состоянии покоя, так и при воздействии различных экстремальных раздражителей [2]. Кроме того, печень играет существенную роль в метаболизме глюкокортикоидов [8]. С этих позиций печень может быть рассмотрена как звено регуляции

активности нейроэндокринной оси гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников (ГГАС). Атрибутивным признаком ПТСР считается сниженный уровень глюкокортикоидов. Считается, что основной причиной этого является низкая активность  $11\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы – фермента, осуществляющего обратимую инактивацию глюкокортикоидов [12]. Важнейшим ферментом, регулирующим тканевой обмен глюкокортикоидов, является  $11\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа ( $11\beta$ ГСДГ). Существуют 2 изоформы  $11\beta$ ГСДГ [6]. Первая изоформа –  $11\beta$ ГСДГ-1 является НАДФН-зависимой. Она, как уже ранее упоминалось, обеспечивает регенерацию окисленных форм кортикостероидов. Вторая форма  $11\beta$ ГСДГ-2 является НАДН-зависимой. Она обеспечивает окисление кортикостероидов по гидроксильной группе у 11 атома углерода. Следует отметить, что  $11\beta$ ГСДГ-2 преимущественно экспрессируется в почках. В печени преимущественно экспрессируется  $11\beta$ ГСДГ-1 [4]. Но при этом остается непонятным, каким образом гепатоциты печени могут осуществлять окисление преднизолонa, если в органе не экспрессируется  $11\beta$ ГСДГ-2?

Скорее всего, это связано со способностью  $11\beta$ ГСДГ-1 в зависимости от соотношения НАДФН/НАДФ<sup>+</sup> осуществлять реакцию как в прямом, так и в обратном направлении. В тканевой метаболизм глюкокортикоидов оказываются вовлеченными и различные изоформы цитохрома р450. В частности, изоформы СYP3A осуществляет необратимую инактивацию глюкокортикоидов. С этих позиций можно ожидать усиление интенсивности микросомальной электроннотранспортной цепи, замкнутой на цитохроме р450. Поэтому в данном исследовании мы сопоставляли изменения уровня кортикостерона с изменениями реверсивной активности  $11\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы, а также с изменениями уровня микросомального окисления печени в динамике развития синдрома посттравматических стрессорных расстройств (ПТСР).

#### **Материалы и методы исследования**

Исследование выполнено на 40 белых беспородных крысах. Посттравматическое стрессовое расстройство моделировали путем содержания животных в условиях постоянного и неизбежного воздействия сильного безусловного раздражителя – запаха хищника. Контрольную группу составили интактные животные, не подвергавшиеся стрессорным воздействиям (n=16). Для оценки динамики изменений активности ферментов и содержания продуктов свободнорадикального окисления было сформировано четыре опытных группы. Продолжительность воздействия для всех групп составляла 10 суток. Первая опытная группа после десятисуточного воздействия стрессора содержалась в обычных условиях еще в течение 3 суток, вторая – 7 суток, третья – 10 суток (n=8). Реверсивную активность  $11\beta$ ГСДГ-1 в гомогенатах печени определялась с использованием методологического

подхода, описанного О.П. Черкасовой. Об активности фермента судили по уменьшению концентрации 11 $\beta$ -гидроксистероидов в инкубационной смеси, которая регистрировалась флюорометрическим методом [3]. Содержание цитохромов р450 и b5 в микросомах печени определяли по методу Omura T., Sato R, 1964 [7]. Оксидоредуктазную активность оценивали с помощью искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорфенол индофенола (Карузина И.И. и Арчаков А.И., 1972) [1]. Результаты обработаны методами вариационной статистики и выражены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Оценка статистически значимых различий осуществлялась с помощью непараметрических критериев. Статистические взаимосвязи изучали при помощи непараметрического корреляционного анализа, выполняя расчет коэффициентов корреляции рангов по Спирмену.

### Результаты исследований и их обсуждение

В ходе исследований установлено, что спустя 3 суток после завершения повторных стрессорных воздействий наблюдалось снижение уровня анксиогенной дефекации, что говорит об анксиолитическом характере изменения поведенческой активности (контроль:  $1,75 \pm 1,18$ ;  $n=5$ ; опыт:  $0,25 \pm 0,25$   $n=8$ ;  $p < 0.05$ ), таблица.

Изменение показателей поведенческой активности, содержания кортикостерона, активности 11 $\beta$  ГСДГ и показателей микросомального окисления при экспериментальном синдроме посттравматического стрессового расстройства ( $M \pm SD$ )

Показатель	14 суток после завершения воздействия	
	Контроль	опыт
Время в открытых рукавах, (сек)	40,25 $\pm$ 8,33	20,57 $\pm$ 4,99*
Время в закрытых рукавах, (сек)	484,25 $\pm$ 51,42	570,33 $\pm$ 43,71*
Количество заходов в открытые рукава	4,00 $\pm$ 2,04	1,25 $\pm$ 0,79*
Количество заходов в закрытые рукава	8,75 $\pm$ 1,65	9,25 $\pm$ 1,35*
Индекс тревожности	0,64 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,04*
Количество дефекаций	0 $\pm$ 0	2,25 $\pm$ 0,44*
Кортикостерон (нмоль/л)	365,56 $\pm$ 64,5	112,76 $\pm$ 27,4*
11 $\beta$ ГСДГ (нМоль/ мин /гр)	0,55 $\pm$ 0,24	0,66 $\pm$ 0,32
Цитохром р450 (нмоль/мг.белка)	0,49 $\pm$ 0,2	0,18 $\pm$ 0,05*
Цитохром b5 (нмоль/мг.белка)	0,53 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,07*

Примечание: \* – статистически значимые отличия между группами «контроль» и «опыт»,  $p < 0.05$ .

При этом в крови уровень кортикостерона (контроль:  $333,3 \pm 38,51,8$  нмоль/л  $n=5$ ; опыт:  $390,3 \pm 68,50$  нмоль/л;  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ), а также уровень активности  $11\beta$ ГСДГ (контроль:  $0,55 \pm 0,18$  нмоль/мин /гр  $n=5$ ; опыт:  $0,66 \pm 0,15$  нмоль/мин/гр  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ) не отличался статистически значимо, по сравнению с контролем. В это время для печени характерно снижение микросомального окисления в виде уменьшения содержания цитохрома р450 (контроль:  $0,58 \pm 0,07$  нмоль/мг белка  $n=5$ ; опыт:  $0,49 \pm 0,05$  нмоль/мг белка  $n=8$ ;  $p < 0.05$ ). Через 7 суток после завершения повторных стрессорных воздействий отсутствовали статистически значимые различия по уровню поведенческой активности. Однако уровень кортикостерона (контроль:  $395,5 \pm 115,54$  нмоль/л  $n=5$ ; опыт:  $255,5 \pm 125,50$  нмоль/л  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ) и уровень активности печеночной  $11\beta$ ГСДГ (контроль:  $0,59 \pm 0,29$  нмоль/мин/гр  $n=5$ ; опыт:  $0,76 \pm 0,11$  нмоль/мин/гр  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ) не претерпевали статистически значимых различий, по сравнению с контролем. Кроме того, в печени в этот период сохранялся пониженный уровень цитохрома р450 (контроль:  $0,51 \pm 0,06$  нмоль/мг белка  $n=5$ ; опыт:  $0,39 \pm 0,04$  нмоль/мг белка  $n=8$ ;  $p < 0.05$ ). На 10 сутки обнаружено наличие поведенческих расстройств в виде повышения уровня анксиогенной дефекации (контроль:  $0,0 \pm 0,0$   $n=5$ ; опыт:  $2,25 \pm 0,16$   $n=8$ ;  $p < 0.05$ ). При этом содержание кортикостерона (контроль:  $345,7 \pm 88,67$  нмоль/л  $n=5$ ; опыт:  $280,3 \pm 94,78$  нмоль/л  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ), а также активности  $11\beta$ ГСДГ (контроль:  $0,48 \pm 0,12$  нмоль/мин/гр  $n=5$ ; опыт:  $0,56 \pm 0,13$  нмоль/мин/гр  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ) печени не отличалось статистически значимо от контроля. В этот период характерно угнетение микросомального окисления в печени, что проявлялось в снижении содержания цитохрома b5 (контроль:  $0,78 \pm 0,07$  нмоль/мг белка  $n=5$ ; опыт:  $0,39 \pm 0,05$  нмоль/мг белка  $n=8$ ;  $p < 0.05$ ). На 14 сутки после завершения повторных стрессорных воздействий наблюдалось развитие симптоматики ПТСР, это проявлялось в росте индекса тревожности в результате снижения времени пребывания в открытых рукавах крестообразного лабиринта (Таблица). Рост тревожности сопровождался снижением на 72 % уровня кортикостерона в крови, по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Снижение уровня кортикостерона не сопровождалось снижением уровня реверсивной активности  $11\beta$ ГСДГ-1. Зато в это время на 72 % ( $p < 0.05$ ), по сравнению с контролем, оставалось сниженным содержание цитохрома р450 в микросомах. Кроме того, на 55 % оставалось сниженным содержание цитохрома b5 ( $p < 0.05$ ), по сравнению с контролем.

В настоящее время имеются как клинические, так и экспериментальные исследования, демонстрирующие эффективность стероидной терапии для коррекции симптомов ПТСР. Cohen et al (2004) продемонстрировали коррекцию поведенческих расстройств при введении кортикостерона животным [5]. В своих исследованиях они использовали модель ПТСР, в которой имеет место однократный контакт грызунов с ароматами кошки и последующим

периодом покоя в течение 30 дней. При таком подходе не наблюдалось снижение уровня эндогенного кортикостерона. В нашей модели осуществлялась многократная экспозиция запаха хищника. Это и привело к воспроизведению такого характерного для больных ПТСР эндокринологического сдвига, как снижение уровня глюкокортикоидов. Таким образом, развитие тревожной симптоматики на 14 сутки ассоциировано со снижением уровня кортикостерона. В связи с этим возникает вопрос, что повлекло за собой снижение уровня кортикостерона у крыс при такой постановке ПТСР? Согласно представлениям Yehuda and Seckl (2011) основным моментом в снижении уровня глюкокортикоидов при ПТСР является нарушение их тканевого метаболизма [11]. При этом ключевым событием является обратимая инактивация глюкокортикоидных гормонов 11 $\beta$ ГСДГ-зависимой реакции. Следует отметить, что для оценки уровня 11 $\beta$ ГСДГ-зависимой инактивации глюкокортикоидов мы использовали реакцию обратимого окисления глюкокортикоидного препарата преднизолонa, в то время как этот фермент эндогенные глюкокортикоиды метаболизирует гораздо лучше, чем экзогенные. Тем не менее наш подход позволяет косвенно оценить способность печени к регуляции уровня глюкокортикоидов в организме. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что 11 $\beta$ ГСДГ-зависимая инактивация глюкокортикоидов может быть минорным фактором в развитии сниженного уровня глюкокортикоидов при ПТСР. Поэтому в дальнейшем мы сфокусировали внимание на соотношении между уровнем кортикостерона и уровнем микросомального окисления при ПТСР. Интерес к состоянию микросомального окисления печени был связан с полученными в нашей лаборатории предварительными результатами, в которых продемонстрировано, что животные, относящиеся к группе медленных метаболизеров, в большей мере подвержены ПТСР, чем быстрые метаболизеры [9]. Как видно из представленных результатов, угнетению микросомального окисления предшествовало снижение уровня кортикостерона, а значит, длительное угнетение цитохром р450-зависимых монооксигеназ может способствовать развитию гипокортикоидного состояния при ПТСР. Если транслировать полученные результаты на клинический материал, то тогда открываются новые перспективные исследования показателей микросомального окисления в качестве новых маркеров ПТСР. Важно понять причины снижения уровня микросомального окисления в динамике развития ПТСР. В ходе развития ПТСР наблюдаются изменения обмена уровня нейротрансмиттеров в головном мозге и повышение уровня провоспалительных цитокинов. Каждый из этих факторов взятый по отдельности может привести к угнетению микросомального окисления. Между тем одним из характерных признаков действия цитокинов является угнетение активности цитохром р450-зависимых монооксигеназ. Поэтому мы склонны считать, что нарушение микросомального окисления в условиях ПТСР имеет отчасти цитокин-зависимый характер. Вместе с тем сниженный

уровень микросомального окисления может быть связан с супрессивным действием биогенных аминов на активность цитохром р450-зависимых монооксигеназ. Но еще более весомая супрессия микросомального окисления в печени осуществляется цитокинами. Ранее нами было показано, что в условиях повторных стрессовых воздействий наблюдалось угнетение изоформ цитохрома р450, которое полностью отменил рецепторный антагонист IL-1 анакинра [10]. Провоспалительные цитокины могут угнетать как супрессию, так и каталитическую активность цитохром р450-зависимых монооксигеназ [13]. Этот эффект опосредован NO, который генерируется цитокин-зависимой индуцибельной NO-синтазой. В свою очередь ингибиторное влияние NO на каталитическую активность цитохром р450-зависимых монооксигеназ связано со способностью взаимодействовать с атомом Fe гема. Вместе с тем цитохром р450-зависимые монооксигеназы широко представлены среди ферментов стероидогенеза надпочечников. Поэтому не исключено, что на фоне гиперцитокинемии происходит также цитокин-зависимая, NO-опосредованная супрессия ферментов стероидогенеза. В итоге длительная гиперцитокинемия может привести к наличию надпочечниковой недостаточности и тем самым усугубить гипокортикостероидемию. Интересно отметить, что характерное для 14 суток снижение уровня цитохрома р450 синхронизировано со снижением уровня кортикостерона. Вполне возможно, что сниженный уровень глюкокортикоидов благоприятствует формированию так называемого «цитокинового шторма». Иными словами, в этой ситуации снижается мощность антицитокинового действия глюкокортикоидов. Скорее всего, угнетение микросомального окисления играет здесь адаптивную роль, так как среди изоформ цитохрома р450 имеются изоформы метаболизирующие глюкокортикоиды (в основном CYP3A1 CYP3A2 у крыс). Супрессия активности этих изоформ при сниженном уровне глюкокортикоидов сдерживает дальнейшее развитие гипокортицизма.

*Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда: Грант № 17-15-013418.*

### **Список литературы**

1. Карузина И.И. Самоинактивация цитохрома P450 в каталитическом цикле / И.И. Карузина, Г.И. Бачманова, А.И. Арчаков // Вестн. РАМН. – 1995. – № 2. – С. 17 – 29.
2. Цейликман В.Э Стресс и неспецифический реактивный гепатит / В.Э. Цейликман О.Б. Цейликман. – Челябинск: Изд-во ЮУрГУ, 2008. – 160 с.

3. Черкасова О.П. Особенности активности 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы в тканях гипертензивных крыс линии НИСАГ / О.П. Черкасова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т.141, № 1. – С.35-37.
4. Chapman K. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action / K. Chapman, M. Holmes, J. Seckl // *Physiol. Rev.* 2013. Jul. 93(3). P. 1139-206.
5. Cohen H., Benjamin J., Kaplan Z., Kotler M. Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2000.10. P. 429-435.
6. Konstantakou P., Mastorakos G., Vrachnis N., Tomlinson J.W., Valsamakis G. Dysregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: implications during pregnancy and beyond // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2017. Feb. 30(3). P. 284-293. Epub. 2016. Apr. 19. Review.
7. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsome. Evidence of haemoprotein nature // *J. Biol. Chem.* 1964. 239. P. 2370–2378.
8. Rose K.A., Holman N.S., Green A.M., Andersen M.E., LeCluyse E.L., Rose K.A., Holman N.S., Green A.M., Andersen M.E., Le Cluyse E.L. Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity // *J. Pharm. Sci.* 2016 Feb. 105(2). P. 950-964. doi: 10.1016/S0022-3549(15)00192-6.
9. Tseylikman O.B., Lapshin M.S., Kozochkin D.A., Komelkova M.V., Kuzina O.V., Golodniy S.V., Lazuko S.S., Tseylikman V.E. Behavioral Activity and Some Markers of Posttraumatic Stress Disorder among Serotonergic System Indicators and Glucocorticoid Metabolizing Enzymes in Rats with Different Duration of Hexenal Sleep // *Bull Exp. Biol. Med.* 2016. Aug. 161(4). P.456-9. doi: 10.1007/s10517-016-3437-8. Epub. 2016. Sep. 6.
10. Tseilikman V., Kozochkin D., Synitsky A., Sibiriak S., Tseilikman O., Katashinsky E., Nikitina A., Vinogradov D., Simbirtsev A. Does stress-induced release of interleukin-1 cause liver injury? // *Cell Mol. Neurobiol.* 2012. Oct. 32 (7). P.1069-78. Epub. 2012. Aug.
11. Yehuda R., Seckl J. Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis // *Endocrinology* 2011.152. P. 4496-4503.
12. Zhoua, H.Y., Hua G.X., Lianb Q.Q., Morrisc D., Ge R.S. The metabolism of steroids, toxin sand drugs by 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase 1 // *Toxicology.* – 2012 (292). – C. 1–12.
13. Zhou J., Li F. Potential pharmacokinetic interactions of therapeutic cytokines or cytokine modulators on small-molecule drugs: mechanistic understanding via studies using in vitro systems // *Drug Metabol. Drug Interact.* 2014. 29(1). P.17-28. doi: 10.1515/dmdi-2013-0028.