

## ◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 612.018:577.175.632:577.121:618.4

А. В. Камерницкий<sup>1</sup>, И. С. Левина<sup>1</sup>, А. П. Милованов<sup>2</sup>, А. С. Халанский<sup>2</sup>**БЛИЖАЙШИЕ МЕТАБОЛИТЫ ПРОГЕСТЕРОНА (4,5-ДИГИДРОПРОГЕСТЕРОНЫ) — ВОЗМОЖНЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ НАЧАЛА РОДОВ<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Группа химии стероидов и оксипиринов (руководитель — проф. А. В. Камерницкий) Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, <sup>2</sup>лаборатория патологической анатомии болезней детского возраста (зав. — проф. А. П. Милованов) Института морфологии человека РАН, Москва

*Изучение влияния 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-дигидропрогестеронов, структурных аналогов ближайших метаболитов прогестерона (4,5-дигидропрогестеронов), на ткани матки интактных, оплодотворенных и псевдобеременных крыс показало, что они вызывают деструкцию эпителия матки. Этот эффект не сказывается на скорости и полноте имплантации зародыша, но может играть роль в процессе родов, облегчая отторжение плода. Ранее нами было показано, что указанные аналоги метаболитов прогестерона снимают блокировку последним рецептора окситоцина и вызывают деструкцию миометрия псевдобеременных животных. Эти факты позволяют высказать предположение о том, что природные метаболиты прогестерона — 4,5-дигидропрогестероны, накапливаясь к концу беременности, могут играть роль пусковых соединений — "гормонов родов".*

**Ключевые слова:** эпителий матки, деструкция, 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ -дигидропрогестерон, дигидропрогестероны, гормоны родов.

*The effects of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclohexanodihydroprogesterone, the structural analogues of the closest progesterone metabolites (4,5-dihydroprogesterones) on the uterine tissues of intact, impregnated, and pseudopregnant rats has demonstrated that they cause uterine epithelial destruction. This effect does not affect the rate and completeness of fetal implantation, but it may play a role during labor, by facilitating fetal rejection. Earlier studies have indicated that the above analogues of the metabolites of progesterone eliminate the latter-induced oxytocin receptor blockade and cause myometrial destruction in pseudopregnant animals. These facts suggest that by accumulating by the end of pregnancy, the natural progesterone metabolites (4,5-dihydroprogesterones) can act as trigger compounds - "labor hormones".*

**Key words:** uterine epithelium, destruction, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclohexane-5 $\alpha$ -dihydroprogesterone, dihydroprogesterones, labor hormones.

При изучении биологических свойств 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -прегнан-3,20-дионов (I) и (II), аналогов ближайших метаболитов природного прогестерона, проявивших антигормональные свойства [7], мы обнаружили [4], что введение этих препаратов псевдобеременным крысам, приведенным в это состояние путем эстрогенизации (4 дня) и обработки прогестинном (14 дней), вызывает резкую деструкцию гипертрофии миометрия, в то же время слабее влияя на эндометрий. Ранее установлено низкое сродство препаратов (I) и (II) к классическому цитозольному рецептору прогестерона (РП) [10]. Исследование ткани матки псевдобеременных животных на наличие еще каких-либо цитозольных рецепторных центров, специфически связывающих тестируемые соединения, показало полное их отсутствие. Все это свидетельствовало, по-видимому, о независимости антигормонального действия дигидросоединений (I) и (II) от РП.

Избирательность антигормонального действия препаратов (I) и (II), приводящего преимущественно к деструкции миометрия, заставила нас заинтересоваться наличием каких-либо других проявлений влияния этих соединений. Для проверки такой возможности было проведено гистологическое исследование влияния (I) и других стероидов ряда прегна-D'-пентанов (16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклоалканопрогестеронов) [6] на ткань матки интактных неполовозрелых самок крыс. Как оказалось, единственным препаратом, давшим заметный эффект, явился 5 $\alpha$ -дигидропентан (I), вызвавший деструкцию эпителия

матки, проявляющуюся в утрате четко выраженного расположения клеток и уменьшении толщины слоя.

Обнаружение такого, по-видимому, мембранотропного эффекта ближайшего метаболита прогестерона представляло несомненный интерес, поскольку эпителий матки играет значительную роль в самом начале беременности в процессе имплантации, образуя "окна", обеспечивающие возможность приклеивания зародыша к его поверхности и образования "ворот" для проникновения зародыша в эндометрий и предотвращения отторжения последним чужеродных белков зародыша [9]. Обнаруженный факт деструкции эпителия мог бы внести изменения в протекание процесса имплантации. В связи с этим был поставлен эксперимент по введению 5 $\alpha$ -дигидропентана (I) (по 0,2 мг на животное подкожно) оплодотворенным крысам на 4–7-й день и исследованию состояния матки животных, забитых на 11-й день после оплодотворения.

**Материалы и методы**

В экспериментах использовали 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ -прегнан-3,20-дион (I), синтезированный ранее [7].

Для обнаружения возможных эффектов 5 $\alpha$ -дигидро-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексано-прогестерона (I) и других прегна-D'-пентанов использовали неполовозрелых самок крыс, которым однократно внутримышечно вводили раствор стероида (по 0,2 мг на животное в масле). Через 1 сут после введения животных декапитировали под наркозом, матки выделяли и после обычной гистологической проводки с помощью микротомы делали перпендикулярные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопирование показало, что

<sup>1</sup>Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 02-03-32523.

Влияние введения 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклогексано-5 $\alpha$ -дигидропрогестерона на протекание имплантации зародышей у крыс

Группа животных	Общее число срезов	В том числе, %					
		интактных	1-я группа*	2-я группа*	3-я группа*	4-я группа*	5-я группа*
Контрольная (n = 6)	185	8,1	29,5	24,2	8,7	13,4	16,4
Опытная (n = 6)	245	9,7	15,6	24,1	10,0	17,5	23,1

Примечание. Из общего числа срезов в контроле обнаружено 1,6% срезов с анэмбрионией и другими дефектами, в опыте — 3,8%. \* — объяснения в тексте.

единственным достоверным результатом действия соединения (I) является деструкция маточного эпителия.

Для изучения влияния препарата (I) на протекание имплантации использовали взрослых самок крыс, которых разделили на 2 группы (контрольную и опытную) по 6 животных. В ходе предварительного обследования оплодотворенных крыс (факт оплодотворения определяли по влажностному мазку) на 4–9-й день установлено, что имплантация отмечается на 7-й день после оплодотворения.

Подопытным животным на 4, 5, 6, 7-е сутки вводили раствор (I) в масле (по 0,2 мг на животное внутримышечно). На 10–11-е сутки после оплодотворения животных контрольной и опытной групп декапитировали под наркозом, матку и яичники выделяли и подвергали гистологической проводке. Блоки с утолщениями маточных труб разрезали на микроотоме перпендикулярно с частотой не менее 20–22 срезов, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Данные серийные срезы соответствовали различным сегментам утолщений труб (случайная выборка). Определение результатов проводили на световом микроскопе (ув. 100). Для сравнения и оценки срезы матки разделили на 5 групп по степени децидуализации стромы эндометрия, объема цитотрофобластической инвазии и формирования зародышевых структур: 1-я — с частичной децидуализацией при отсутствии инвазии и сохранении просвета трубы; 2-я — с частичной децидуализацией с началом инвазии при сохранении просвета; 3-я — с полной децидуализацией (просвет отсутствует) без цитобластической инвазии; 4-я — с полной децидуализацией и распространенной цитотрофической инвазией; 5-я — с выявленными экстраэмбриональными структурами (стенка желточного мешка, амниотические мембраны и части зародыша).

Кроме того, учитывали интактные сегменты маток. Отмечены также элементы анэмбрионии (главным образом в 4-й и 5-й группах), отнесенные ко всему числу срезов. Полученные результаты приведены в таблице.

## Результаты и их обсуждение

Результаты эксперимента показывают, что введение антигормона не только не снизило возможность имплантации, но даже несколько облегчило и ускорило ее протекание. Это проявилось в достоверном увеличении размеров и степени развития зон децидуализации и числа экстраэмбриональных структур. Очевидно, что дигидропрогестинны не влияют на уже образовавшиеся "окна" эпителия, но, скорее всего, облегчают blastocyste доступ к ним. Причина увеличения числа погибших зародышей пока неясна, но может быть связана с воздействием антигормона на оплодотворенную яйцеклетку в полости матки до ее имплантации [8].

Судя по всему, дигидропентараны (I) и (II) и, скорее всего, ближайшие нативные метаболиты прогестерона

(5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -дигидропрогестероны) действительно не влияют на эндометриальную прогестинную функцию прогестерона и не являются его антагонистами в этом отношении. Это полностью согласуется с полученными ранее предварительными данными [11] об отсутствии заметного контрацептивного влияния раннего (1–6-й день после оплодотворения) введения 5 $\alpha$ -дигидропентарана (I) на число выношенных крысят.

Помимо участия эпителия матки в имплантации, известно [9], что на самых последних стадиях беременности при подготовке к родам происходит почти полное исчезновение маточного эпителия, облегчающее, по-видимому, отторжение плода. Принято считать, что это обусловлено механическим растяжением его под влиянием плода, однако обнаруженное влияние 5 $\alpha$ -дигидропентарана позволяет предположить, что это явление может быть связано с мембранотропным эффектом ближайших метаболитов прогестерона, накапливающихся к концу беременности [9]. Такое предположение заставило нас вернуться к исследованию состояния маточного эпителия в опыте [4] по формированию псевдобеременности и ее прекращению с помощью 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -дигидропентаранов (I) и (II). Как показал просмотр препаратов у животных, обработанных этими соединениями, эпителий матки псевдобеременных крыс, получавших соединение (I), претерпел определенные изменения: он утратил свою целостность, между сохранившимися частями зияют довольно обширные участки либо лишенные его вообще, либо содержащие отдельные характерные клетки эпителия. Имеются участки с резко разреженными клетками. Все это свидетельствует о имеющейся и здесь тенденции к деструкции эпителия матки под влиянием аналога дигидропрогестерона.

Обнаруженное действие 5 $\alpha$ -дигидропентарана (I) подтверждает отмеченную нами [2] независимость его частичного антипрогестинного действия от классического цитозольного РР и, следовательно, неклассический характер прямого действия самого нативного прогестерона на эти ткани. На это же указывает описанная нами ранее [1–3] неспособность 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -циклоалканопрогестеронов с 3–5-членными D'-карбоциклами, обладающих высоким сходством к РР и высокой активностью в тесте Клауберга—Мак-Фейла, влиять на сохранение беременности.

## Заключение

Открытая способность аналогов ближайших природных метаболитов прогестерона вызывать деструкцию эпителия матки вкуче с проявленным ими снятием прогестероновой блокады действия окситоцина [5] и последующим деструктивным действием на гипертрофию миометрия [4] доказывают, что первичные метаболиты прогестерона — 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -дигидропрогестероны — могут являться наиболее вероятными кандидатами на роль инициаторов родового процесса — своего рода "гормонами родов".

## ЛИТЕРАТУРА

1. Камерницкий А. В., Игнатов В. Н., Левина И. С. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1977. — № 10. — С. 96–98.
2. Камерницкий А. В., Куликова Л. Е., Левина И. С. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1979. — № 10. — С. 40–44.
3. Камерницкий А. В., Игнатов В. Н., Левина И. С. и др. // Хим.-фарм. журн. — 1984. — № 1. — С. 45–48.
4. Камерницкий А. В., Левина И. С., Куликова Л. Е. и др. // Биоорг. химия. — 2002. — Т. 28. — С. 261–268.
5. Карева Е. Н., Камерницкий А. В., Левина И. С. и др. // Эксперим. и клин. фармакол. — 1990. — Т. 62, № 5. — С. 25–27.
6. Левина И. С., Камерницкий А. В. // Хим.-фарм. журн. — 1990. — Т. 24, № 10. — С. 31–39.

7. Левина И. С., Никитина Г. В., Куликова Л. Е., Камерницкий А. В. // Изв. АН СССР. Сер.: Химия. — 1995. — № 3. — С. 564—568.
8. Никитина Г. В., Корхов В. В., Никитин А. И. и др. // Арх. анат. — 1986. — Т. 90, № 4. — С. 70—73.
9. Петтен В. Эмбриология человека. — М., 1959. — С. 49—93.
10. Смирнов А. Н., Покровская Е. В., Левина И. С. и др. // Фармакол. и токсикол. — 2001. — Т. 131. — С. 293—296.
11. Ponsold K., Kash H., Stolzner W. et al. // Pat. DDR 263776 A1, 1989.

Поступила 29.10.04

© С. В. Гейн, Т. А. Баева, 2005

УДК 612.015.08

С. В. Гейн, Т. А. Баева

## РОЛЬ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ИЗМЕНЕНИИ Th1/Th2-ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ<sup>1</sup>

Аналитическая лаборатория (зав. — канд. г.-м наук М. А. Шишкин) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, кафедры микробиологии и иммунологии (зав. — акад. РАН В. А. Черешнев) Пермского государственного университета

Изучена роль β-эндорфина на фоне блокады опиатных рецепторов и селективных агонистов μ- и δ-рецепторов DAMGO и DADLE на реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и продукцию IL-1β, γ-IFN и IL-4 в присутствии фитогемагглютинина (ФГА). Установлено, что β-эндорфин, налоксон и селективные μ- и δ-агонисты стимулировали ФГА-индуцированную РБТЛ, не влияя на спонтанный пролиферативный ответ. На фоне блокады опиатных рецепторов эффект β-эндорфина не отменялся, а напротив, усиливался, так как налоксон оказывал самостоятельное стимулирующее действие на РБТЛ. В условиях предварительной обработки опиоидами в течение 1 ч влияния на пролиферативный ответ не зарегистрировано. β-эндорфин, налоксон и DADLE усиливали ФГА-индуцированную продукцию IL-4. Налоксон оказывал разнонаправленное влияние на синтез этого цитокина, угнетая его в спонтанном варианте. На продукцию IL-1β и γ-IFN опиоидные пептиды и налоксон влияния не оказывали. Высказано предположение о том, что β-эндорфин, налоксон и селективные μ- и δ-агонисты способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов в сторону Th2-клеток.

**Ключевые слова:** опиоидные пептиды, лимфоциты, Th1/Th2-цитокинный профиль.

The authors studied a role of β-endorphin during the blockade of opiate receptors and selective μ- and δ-receptor agonists DAMGO and DADLE to the reaction of lymphocytic blast-cell transformation (RLBCT) and to the production of IL-1β, γ-IFN, and IL-4 in the presence of phytohemagglutinin (PHA). It was found that β-endorphin, naloxone, and the selective μ- and δ-receptor agonists stimulated PHA-induced RLBCT, without affecting a spontaneous proliferative response. During opiate receptor blockade, the effect of β-endorphin was not abolished, but, on the contrary, enhanced as naloxone exerted a stimulating effect on RLBCT. A proliferative response was not recorded during preliminary one-hour opioid treatment. β-endorphin, naloxone, and DADLE enhanced the PHA-induced production of IL-4. Naloxone exerted a heterodirectional effect on the synthesis of this cytokine, by inhibiting it spontaneously. The opioid peptides and naloxone produced no effect on the production of IL-1β and γ-IFN. It is suggested that β-endorphin, naloxone, and the selective μ- and δ-receptor agonists promote the differentiation of T lymphocytes towards Th2-cells.

**Key words:** opioid peptides, lymphocytes, Th1/Th2-cytokine profile.

Поддержание внутреннего гомеостаза определяется взаимодействием трех основных систем организма: нервной, эндокринной и иммунной. В настоящее время известно, что иммунная система многокомпонентна и ее функционирование обеспечивается сложной сетью взаимосвязанных сигналов. Эндогенные опиоидные пептиды являются одними из важнейших посредников во взаимодействии нервной и иммунной систем, кроме этого, они представляют собой группу факторов, играющих ключевую роль в процессах адаптации организма [8, 14]. Несмотря на то что изучению влияния эндогенных опиоидных пептидов на процессы пролиферации уделено достаточно много внимания [1, 2, 11], вопрос о механизмах реализации эффектов опиоидов, в частности β-эндорфина, способного действовать через несколько типов опиатных рецепторов, остается актуальным. Также недостаточно изученной остается проблема влияния опиоидных пептидов на продукцию ряда ключевых цитокинов (γ-IFN, IL-4, IL-10, IL-12), являющихся маркерными для регуляторных Т-лимфоцитов 1-го и 2-го типа (Th1/Th2) и определяющих выбор типа иммунного ответа [4, 12, 13]. Цель работы — оценка влияния β-эндорфина на фоне блокады опиатных рецепторов и селективных δ- и μ-агонистов на пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro*

и установка взаимосвязи пролиферативных процессов с продукцией IL-1β, γ-IFN и IL-4.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте 22—30 лет. Лейкоциты культивировали с фитогемагглютинином Р — ФГА ("Sigma"; конечная концентрация в культуре составляла 2,5 мкг/мл) в 96-луночных круглодонных планшетах. Каждая культура содержала  $2 \cdot 10^5$  клеток в 0,2 мл полной питательной среды, которую готовили на основе среды 199 с добавлением 10 мм HEPES ("Sigma"), 2 mM L-глутамин ("Sigma"), 100 мкг/мл гентамицина и 10% аутоплазмы. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 72 ч. За 18 ч до окончания культивирования в каждую лунку вносили по 2 мкКи <sup>3</sup>H-метилтимидина ("Изотоп", Санкт-Петербург) в объеме 10 мкл. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Guardian" ("Wallac", Финляндия).

В эксперименте использовали β-эндорфин ("Sigma") в концентрации 10<sup>-7</sup> М; μ-агонист DAMGO ([d-Ala<sub>1</sub>, N-Me-Phe<sub>4</sub>, Gly<sub>5</sub>-ol]-энкефалин; "Sigma") — 10<sup>-8</sup> М; δ-агонист DADLE ([d-Ala<sub>2</sub>, d-Leu<sub>5</sub>]-энкефалин; "Sigma") — 10<sup>-7</sup> М; налоксона гидрохлорид ("DuPont", США) — 10<sup>-6</sup> М. Выбор концентрации опиоидов и ФГА основывался на

<sup>1</sup>Работа поддержана грантом программы президиума РАН № 27 "Молекулярная и клеточная биология".