

17-ОН-П. Наиболее достоверным гормональным критерием НК21-ОН следует считать базальный уровень 17-ОН-П, превышающий 20 нмоль/л.

4. Среди девочек с НК21-ОН с преждевременным адrenaрхе глюкокортикоидной терапии требуются большие с прогрессирующей андрогенизацией, существенным ускорением темпов физического развития, а среди девочек с пубертатной гиперандрогенией показанием к началу терапии глюкокортикоидами являются нарушения менструального цикла по типу олиго- или аменореи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Семичева Т. В., Петеркова В. А. Половое развитие детей: норма и патология. — М., 2002.
2. Дедов И. И., Калинин Н. Ю., Семичева Т. В. и др. // Пробл. эндокринологии. — 2004. — № 4. — С. 3—6.
3. Карева М. А., Дедов И. И., Орловский И. В. и др. // Молекуляр. мед. — 2004. — № 2. — С. 60—65.
4. Azziz R., Dewailly D., Owerbach D. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1994. — Vol. 78, N 4. — P. 810—815.
5. Dacou-Voutetakis C., Dracopoulou M. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1999. — Vol. 84, N 5. — P. 1570—1574.
6. Deneux C., Tardy V., Dib A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2001. — Vol. 86, N 1. — P. 207—213.

7. Feldman S., Billaud L., Tharlabard J. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1992. — Vol. 74, N 3. — P. 635—639.
8. Gemmel N. J., Akiyama S. // Trends Genet. — 1996. — Vol. 12, N 9. — P. 338—339.
9. Hawkins L., Chasalow F., Blethen S. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1992. — Vol. 74, N 2. — P. 248—253.
10. Moran C., Azziz R. // Semin. Reprod. Med. — 2003. — Vol. 21, N 3. — P. 295—300.
11. Morel Y., Miller W. // Adv. Hum. Genet. — 1991. — Vol. 20. — P. 1—68.
12. Morris A., Reiter O., Geffner M. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1989. — Vol. 69, N 4. — P. 709—715.
13. New M., Lorenzen F., Lerner A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1983. — Vol. 57, N 2. — P. 320—326.
14. Sherman S., Aston S., Morton N. et al. // Am. J. Hum. Genet. — 1988. — Vol. 42, N 2. — P. 830—838.
15. Speiser P., Dupont B., Rubinstein P. et al. // Am. J. Hum. Genet. — 1985. — Vol. 37, N 4. — P. 650—657.
16. Tajima T., Fujieda K., Nakae J. et al. // Endocr. J. — 1998. — Vol. 45, N 4. — P. 493—497.
17. Wedell A., Luthman H. // Hum. Mol. Genet. — 1993. — Vol. 2, N 5. — P. 499—504.
18. Weintrob N., Brautbar C., Pertzalan A. et al. // Eur. J. Endocrinol. — 2000. — Vol. 143, N 1. — P. 397—403.
19. White P., Speiser P. // Endocr. Rev. — 2000. — Vol. 21, N 3. — P. 245—291.
20. Yarman S., Dursun A., Oguz F., Alagol F. // Endocr. J. — 2004. — Vol. 51, N 1. — P. 31—36.

Поступила 18.07.05

© С. В. ШИРШЕВ, С. А. ЗАМОРИНА, 2006

УДК 612.018.2:577.175.327].06:612.014.1-055.2].08

С. В. Ширшев, С. А. Заморина

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА¹

Лаборатория экологической генетики микроорганизмов (зав. — проф. С. В. Ширшев) Института экологии и генетики микроорганизмов (дир. — проф. В. А. Демаков) УрО РАН, Пермь

Изучено влияние физиологических доз хорионического гонадотропина (ХГ) на окислительную и фагоцитарную активность моноцитов женщин, находящихся в разных фазах менструального цикла. Установлено, что ХГ (100 МЕ/мл) угнетает базальный уровень продукции активных форм кислорода моноцитами и снижает (10 и 100 МЕ/мл) продукцию миелопероксидазы независимо от фазы цикла. Показано, что в фолликулярную фазу цикла ХГ (10 и 100 МЕ/мл) угнетает фагоцитарную активность моноцитов, но одновременно в дозе 100 МЕ/мл повышает латексиндуцированную продукцию активных форм кислорода. В лютеиновую фазу цикла ХГ оказывает opposite эффекты: угнетает показатели латексиндуцированной люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) и стимулирует фагоцитарную активность моноцитов, причем между этими показателями выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость. Таким образом, роль ХГ в регуляции окислительной и фагоцитарной функций моноцитов периферической крови фертильных женщин зависит от фазы менструального цикла и степени активации моноцитов.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, моноциты, фазы менструального цикла.

The effect of physiological doses of chorionic gonadotropin (CG) on monocytic oxidative and phagocytic activities was studied in females having different phases of a menstrual cycle. CG (100 IU/ml) was found to suppress the baseline monocytic production of active oxygen forms and to lower (10 and 100 IU/ml) the generation of myeloperoxidase irrespective of the phase of the cycle. In the follicular phase of the cycle, CG (10 and 100 IU/ml) was shown to inhibit monocytic phagocytic activity, but when given in a dose of 100 IU/ml, it concurrently enhanced the latex-induced production of active oxygen forms. In the lutein phase of the cycle, CG exerted opposite effects: it suppressed the parameters of latex-induced luminescence-dependent chemiluminescence and stimulated monocytic phagocytic activity, moreover, a significant inverse correlation between these parameters. Thus, the role of CG in the regulation of oxidative and phagocytic functions of peripheral monocytes in fertile women depends on the phase of a menstrual cycle and the degree of monocytic activation.

Key words: chorionic gonadotropin, monocytes, menstrual cycle phases.

Известно, что оплодотворенная яйцеклетка уже на уровне бластоцисты начинает продуцировать хорионический гонадотропин (ХГ), который модулирует иммунные реакции матери, поддерживая

жизнеспособность полуаллогенного эмбриона [2, 9]. Концентрация ХГ достигает максимума к 9—11-й неделе беременности, затем снижается и держится на одном уровне вплоть до родов [13]. Гормон выполняет лютеотропную функцию в ранние сроки беременности, поддерживая желтое тело, и участвует в регуляции стероидогенеза у плода [6].

¹Работа поддержана грантом РФФИ-Урал 04-04-96063.

ХГ и лютеинизирующий гормон (ЛГ), в силу структурного сходства, реализуют свои множественные эффекты через один рецептор (ЛГ/ХГ-Р) [14], уровень экспрессии которого меняется в динамике менструального цикла, существенно повышаясь в фолликулярную фазу под действием эстрадиола и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [8]. В различные фазы менструального цикла не только изменяются уровень и соотношение прогестиннов, эстрогенов и гонадотропинов гипофиза [11], но и модулируются иммунные реакции на системном уровне [1, 3], что создает оптимальные условия для оплодотворения и имплантации.

Клетки моноцитарно-макрофагального ряда играют важную роль на всех этапах гестации, накапливаясь в децидуальной оболочке благодаря специфическому стероидному фону, и активно принимают участие в имплантации и плацентации [7]. Более того, в период гестации моноциты и их потомки — дендритные клетки [5] — определяют вид иммунного реагирования, усиливая при определенных условиях активность Т-лимфоцитов-хелперов 2-го типа [10], определяющих трофическую функцию иммунной системы матери в отношении зародыша [12]. Кроме того, моноциты/макрофаги осуществляют функцию клиренса, фагоцитируя патогены, клеточный детрит и апоптотические тельца [4], находясь под постоянным контролем ХГ.

Целью данного исследования явилось изучение влияния ХГ на окислительную и фагоцитарную активность моноцитов женщин в разные фазы менструального цикла.

Материалы и методы

ХГ ("Profasi", Италия) использовали в дозах 10 и 100 МЕ/мл, соответствующих его физиологическим концентрациям в разные триместры беременности [13]. Гормон разводили ех темпоре раствором Хэнкса (НПО "Биолот", Россия). В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови женщин репродуктивного возраста в фолликулярной или лютеиновой фазах менструального цикла. Клетки фракционировали из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина 1,077 г/см³ ("Pharmacia", Швеция; "Sprofa", Чехия), после чего дважды отмывали раствором Хэнкса. В работе использовали краткосрочную культуру клеток: суспензию полученных мононуклеаров ($1 \cdot 10^6$ /мл) инкубировали в течение 1 ч в присутствии ХГ, после чего оценивали их фагоцитарную и окислительную активность.

Окислительную активность моноцитов оценивали по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) при помощи билюцинометра БЛМ-8703М ("Наука", Россия). В пластиковую кювету прибора вносили 800 мкл рабочего раствора, состоящего из 110 мМ NaCl; 10 мМ трис-НСl; 2,5 мМ MgCl₂; 5 мМ глюкозы и $1 \cdot 10^{-4}$ М люминола (рН 7,4). После инкубации в течение 3—5 мин при 37°C и замера фонового свечения добавляли 100 мкл клеточной суспензии ($1 \cdot 10^6$ /мл) и при непрерывном перемешивании измеряли ин-

тенсивность спонтанной ЛЗХЛ. Затем в кювету вносили 100 мкл раствора, содержащего частицы латекса в концентрации $1 \cdot 10^7$ /мл (1,5 мкм; "Диам", Россия), и фиксировали интенсивность стимулированной ЛЗХЛ в динамике на 5, 10, 15 и 20 мин. Результаты выражали в имп в 1 с на 1 моноцит.

Активность миелопероксидазы (МПО) в клеточных супернатантах тестировали спектрофотометрическим методом: 0,05 мл клеточного супернатанта помещали в лунки плоскостонных планшетов, затем вносили 0,10 мл субстратной смеси, состоящей из 0,04% ортофенилендиамина и 0,014% H₂O₂ на фосфат-цитратном буфере (рН 5,0). По истечении 10-минутного периода инкубации при 25°C реакцию останавливали внесением 0,10 мл 10% H₂SO₄. Интенсивность оптической плотности фиксировали с помощью многоканального спектрофотометра "Anthos HMTL III" ("Labtec Instruments", Австрия) при длине волны 492 нм, результаты выражали в единицах оптической плотности (Е).

Фагоцитарную активность оценивали по поглощению частиц полистирольного латекса. Для этого

Таблица 1

Влияние ХГ на показатели ЛЗХЛ моноцитов (в имп/с на 1 моноцит) периферической крови женщин ($M \pm m$)

Группа	Экспериментальное воздействие	Фолликулярная фаза (n = 7)	Лютеиновая фаза (n = 7)
Спонтанный вариант:			
1	контроль гормона	4,09 ± 0,32	4,07 ± 0,50
2	ХГ (10 МЕ/мл)	4,88 ± 0,59	2,78 ± 0,39
	$P^{(2-1)}$		< 0,05
3	ХГ (100 МЕ/мл) $P^{(3-1)}$	2,74 ± 0,30	2,91 ± 0,33
	$P^{(3-1)}$	< 0,05	< 0,05
Стимулированный вариант, 5 мин инкубации			
4	контроль гормона	7,48 ± 0,54	6,52 ± 0,98
5	ХГ (10 МЕ/мл) $P^{(5-4)}$	8,41 ± 0,66	4,06 ± 0,47
			< 0,05
6	ХГ (100 МЕ/мл)	11,05 ± 1,40	4,71 ± 0,61
	$P^{(6-4)}$	< 0,05	
	$P^{(6-4)}$		< 0,05
10 мин инкубации			
7	контроль гормона	6,94 ± 0,56	6,03 ± 0,81
8	ХГ (10 МЕ/мл)	8,38 ± 0,93	3,84 ± 0,49
	$P^{(8-7)}$		< 0,05
9	ХГ (100 МЕ/мл)	10,00 ± 1,11	5,13 ± 0,80
	$P^{(9-7)}$	< 0,05	
15 мин инкубации			
10	контроль гормона	6,19 ± 0,51	5,97 ± 1,03
11	ХГ (10 МЕ/мл)	6,70 ± 1,02	3,56 ± 0,49
	$P^{(11-10)}$		< 0,05
12	ХГ (100 МЕ/мл)	9,35 ± 1,22	5,00 ± 1,03
	$P^{(12-10)}$	< 0,05	
20 мин инкубации			
13	контроль гормона	4,49 ± 0,48	4,90 ± 0,69
14	ХГ (10 МЕ/мл)	5,35 ± 0,71	2,90 ± 0,32
	$P^{(14-13)}$		< 0,05
15	ХГ (100 МЕ/мл)	7,99 ± 0,83	4,26 ± 0,87
	$P^{(15-13)}$	< 0,05	

Примечание. Здесь и далее — P^p парный, P^b непарный t -критерий Стьюдента, значения P представлены только для достоверных (< 0,05) результатов.

Таблица 2

Влияние ХГ на уровень МПО (в Е) в супернатантах кратковременных культур моноцитов женщин ($M \pm m$)

Группа	Экспериментальное воздействие	Фолликулярная фаза ($n = 7$)	Лютеиновая фаза ($n = 7$)
1	Контроль гормона	$0,319 \pm 0,030$	$0,353 \pm 0,022$
2	ХГ (10 МЕ/мл)	$0,248 \pm 0,020$	$0,261 \pm 0,016$
	$P^{(2-1)}$	$< 0,05$	
	$P^{ab(2-1)}$		$< 0,05$
3	ХГ (100 МЕ/мл)	$0,283 \pm 0,021$	$0,244 \pm 0,013$
	$P^{(3-1)}$	$< 0,05$	
	$P^{ab(3-1)}$		$< 0,05$

к 0,1 мл фракционированных мононуклеаров ($1 \cdot 10^6$ /мл) добавляли 0,1 мл отмытой латексной суспензии в концентрации $1 \cdot 10^7$ /мл. Пробы инкубировали при 37°C в течение 20 мин, после чего содержимое пробирок перемешивали и готовили мазок, который фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому—Гимзе. Рассчитывали процент фагоцитоза — количество фагоцитов, захвативших объекты фагоцитоза на 100 подсчитанных моноцитов, и фагоцитарный индекс — количество объектов фагоцитоза, которое в среднем приходится на одну фагоцитирующую клетку.

Статистическую обработку данных проводили с помощью парного (P^a) и непарного (P^b) t -критерия Стьюдента. В ряде случаев рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r).

Результаты и их обсуждение

Учитывая, что биоцидное действие моноцитов, направленное на внеклеточную деструкцию патогенов, осуществляется за счет выброса активных форм кислорода (АФК) с последующей их трансформацией МПО в перекись водорода и галогеноиды, мы оценивали экстрацеллюлярную окислительную активность моноцитов как по продукции АФК, так и по активности секретируемой МПО.

Установлено, что по отношению к моноцитам фолликулярной фазы ХГ оказывал депрессивные эффекты на продукцию АФК, фиксируемую в спонтанном варианте ЛЗХЛ (100 МЕ/мл), и на активность МПО в клеточных супернатантах (10 и

100 МЕ/мл) (табл. 1, 2), несмотря на отсутствие достоверных корреляционных связей. В то же время в латексиндуцированном варианте ЛЗХЛ гормон (100 МЕ/мл) оказывал выраженное стимулирующее действие на окислительную активность моноцитов, которое сохранялось в динамике всего эксперимента (5–20 мин).

Эффекты, оказываемые ХГ на спонтанную окислительную активность моноцитов, полученных от женщин в лютеиновой фазе, были во многом аналогичны. Так, гормон (10 и 100 МЕ/мл) угнетал как ЛЗХЛ, так и активность МПО (см. табл. 1, 2), однако корреляционный анализ показал, что под действием гормона, в отличие от фолликулярной фазы, возникает достоверная обратная корреляционная зависимость между активностью МПО и спонтанной ЛЗХЛ: для ХГ в дозе 10 МЕ/мл $r = -0,7$; для ХГ в дозе 100 МЕ/мл $r = -0,8$. По-видимому, это связано с реципрокными механизмами регулирования НАДФ-оксидазного комплекса и МПО в условиях ХГ-зависимой депрессии окислительного потенциала моноцитов лютеиновой (прогестерон-доминантной) фазы цикла. В отношении индуцированного варианта ЛЗХЛ показано, что ХГ в дозе 100 МЕ/мл снижал окислительную активность латексстимулированных моноцитов только в ранний период инкубации (5 мин), в то время как ХГ в дозе 10 МЕ/мл давал аналогичный эффект на протяжении всего периода наблюдения (см. табл. 1).

При изучении фагоцитарной активности установлено, что внесение высокой дозы ХГ (100 МЕ/мл) в культуру фракционированных моноцитов, полученных от женщин, находящаяся в фолликулярной фазе цикла, приводило к угнетению количества фагоцитирующих клеток и их поглотительной способности. Низкая доза гормона (10 МЕ/мл) также оказывала депрессивное действие, но только в отношении поглотительной активности моноцитов (табл. 3).

В отношении моноцитов, полученных от женщин, находящихся в лютеиновой фазе менструального цикла, ХГ оказывал оппозитные эффекты. Так, гормон в дозе 100 МЕ/мл достоверно увеличивал долю фагоцитирующих моноцитов и их поглотительную активность. ХГ в низкой дозе (10 МЕ/мл) оказывал менее выраженный стимулирующий эффект, затрагивая только процент фагоцитоза (см. табл. 3).

Таблица 3

Влияние ХГ на фагоцитарную активность моноцитов женщин ($M \pm m$)

Группа	Экспериментальное воздействие	Фолликулярная фаза ($n = 7$)		Лютеиновая фаза ($n = 7$)	
		процент фагоцитоза	фагоцитарный индекс	процент фагоцитоза	фагоцитарный индекс
1	Контроль гормона	$53,62 \pm 2,65$	$3,36 \pm 0,12$	$45,37 \pm 2,56$	$2,43 \pm 0,06$
2	ХГ (10 МЕ/мл)	$52,46 \pm 1,70$	$2,88 \pm 0,14$	$52,33 \pm 2,89$	$2,73 \pm 0,17$
	$P^{ab(2-1)}$		$< 0,05$		
	$P^{(2-1)}$			$< 0,05$	
3	ХГ (100 МЕ/мл)	$44,51 \pm 2,19$	$2,99 \pm 0,06$	$55,60 \pm 3,13$	$2,74 \pm 0,11$
	$P^b(3-1)$	$< 0,05$			
	$P^{ab(3-1)}$		$< 0,05$		
	$P^b(3-1)$			$< 0,05$	
	$P^b(3-1)$				$< 0,05$

Корреляционный анализ показал, что в прогестерондоминантную фазу цикла под влиянием ХГ (10 МЕ/мл) возникает достоверная обратная корреляционная зависимость ($r = -0,6$) между поглотительной активностью моноцитов и показателями стимулированной ЛЗХЛ (20 мин), а под влиянием высокой дозы (100 МЕ/мл) — между процентом фагоцитирующих клеток и стимулированной ЛЗХЛ ($r = -0,6$). Возможно, эта зависимость носит компенсаторный характер: под действием ХГ в прогестерондоминантную фазу продукция АФК во внеклеточную среду снижается, что связано с предупреждением антизиготных реакций и защитой собственных тканей от повреждения, но в то же время фагоцитарная активность моноцитов существенно возрастает. Окислительные процессы в это время, по-видимому, направлены на внутриклеточную деструкцию объектов фагоцитоза. Стимуляция фагоцитарной активности моноцитов в лютеиновую фазу цикла может служить одним из необходимых факторов сохранения беременности, так как при помощи фагоцитоза утилизируются не только патогенные агенты, но и апоптотические клетки, избыточное накопление которых в фетоплацентарной зоне может иметь фатальные последствия для плода [4]. В то же время в фолликулярную фазу цикла наблюдаемое нами снижение окислительного потенциала необходимо, по-видимому, для предупреждения антизиготных реакций и защиты собственных тканей от повреждения активными кислородными метаболитами. Возможно, регулируя окислительный потенциал моноцитов, ХГ обеспечивает тонкий баланс между позитивным и негативным эффектом кислородных метаболитов.

Таким образом, ХГ разнонаправленно модулирует экстрацеллюлярную продукцию АФК и фагоцитарную активность моноцитов женщин в зависимости от того, в какую фазу цикла были получены клетки. По-видимому, в разные фазы менструального цикла соотношение половых стероидных гормонов и (или) уровень гипофизарных гормонов (ЛГ, ФСГ, пролактин) за счет перmissивных эффектов формируют разную чувствительность моноцитов к ХГ и определяют направленность его действия, приводящую к успешной имплантации и последующей плацентации оплодотворенной яйцеклетки.

Выводы

1. ХГ угнетает продукцию АФК интактными моноцитами женщин (100 МЕ/мл) и снижает активность секреторной МПО (10 и 100 МЕ/мл) независимо от того, в какую фазу менструального цикла получены клетки.

2. В моноцитах, полученных от женщин в фолликулярной фазе цикла, ХГ (10 и 100 МЕ/мл) угнетает процессы фагоцитоза, но повышает продукцию АФК в индуцированном варианте ЛЗХЛ (ХГ 100 МЕ/мл).

3. В моноцитах лютеиновой фазы ХГ (10 и 100 МЕ/мл) оказывает стимулирующее действие на фагоцитарную активность, но существенно снижает индуцированную экстрацеллюлярную продукцию активных кислородных метаболитов (10 МЕ/мл).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кеворков Н. Н., Шилов Ю. И., Ширшев С. В., Черешнев В. А. Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета. — Екатеринбург, 1993.
2. Ширшев С. В. // Успехи соврем. биол. — 1998. — Т. 118, № 1. — С. 69—85.
3. Ширшев С. В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург, 2002. — Т. 2.
4. Abrahams V. M., Kim Y. M., Straszewski S. L. et al. // Am. J. Reprod. Immunol. — 2004. — Vol. 51, N 4. — P. 275—282.
5. Banchereau J., Steinman R. M. // Nature. — 1998. — Vol. 392. — P. 245—252.
6. Huhtaniemi I. T., Korenbrot C. C., Jaffe R. B. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1977. — Vol. 44. — P. 936—941.
7. Hunt J. S., Robertson S. A. // J. Reprod. Immunol. — 1996. — Vol. 32, N 1. — P. 1—25.
8. Lu D. L., Peegel H., Moiser S. M., Menon K. M. // Endocrinology. — 1993. — Vol. 132, N 1. — P. 235—240.
9. Magnie M., Valtora A., Mareta A. et al. // Medicina (Firenze). — 1990. — Vol. 10, N 2. — P. 148—149.
10. Risoan M. C., Soumelis V., Kadowski N. et al. // Science. — 1999. — Vol. 283. — P. 1183—1185.
11. Ross G. T., Cargille C. M., Lipsett M. B. et al. // Recent Prog. Horm. Res. — 1970. — Vol. 26. — P. 1—14.
12. Wegmann T. G. // Am. J. Reprod. Immunol. — 1987. — Vol. 15, N 2. — P. 67—70.
13. Wide L. // Acta Endocrinol. — 1962. — Vol. 41. — Suppl. 70. — P. 1—100.
14. Yano K., Kohn L. D., Saji M. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1997. — Vol. 82, N 8. — P. 2586—2591.

Поступила 14.05.05