

В заключение хотим еще раз подчеркнуть клиническую многоликость АПС I-го типа, касающуюся как многочисленных масок, затрудняющих диагностику заболевания в начале, так и в определенной степени непредсказуемость дальнейшего течения болезни с наступлением относительной клинко-лабораторной ремиссии в периоде пубертата у ранее декомпенсированной больной и, напротив, формированием в этом возрасте тяжелой декомпенсации у пациентки со стертым нетяжелым дебютом заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илютович Т. Б. // Педиатрия. — 1989. — № 8. — С. 92—93.
2. Никитина И. Л., Астафьева Л. И. // Пробл. эндокринологии. — 2000. — № 6. — С. 37.
3. Фадеев В. В., Шевченко И. В., Мельниченко Г. А. // Пробл. эндокринологии. — 1999. — № 1. — С. 47—54.
4. Фадеев В. В., Мельниченко Г. А. Надпочечниковая недостаточность: Метод. рекомендации. — М., 2001.
5. Czerwiec F. S., Culler G. B. // Curr. Opt. Endocrinol. Diabet. — 1996. — Vol. 3. — P. 239—246.

Поступила 18.04.06

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 612.112.95:612.433.62]:612.64.08

О. Л. Горбунова, С. В. Ширшев, Б. А. Бахметьев

РЕГУЛЯЦИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ХОРИОНИЧЕСКИМ ГОНАДОТРОПИНОМ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

В экспериментах на самках мышей породы Swiss изучали влияние хорионического гонадотропина (ХГ) на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов с учетом этапов формирования гуморального иммунного ответа. Установлено, что введение ХГ стимулирует формирование антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и повышает уровень эндогенного прогестерона в сыворотке крови мышей. В системе *in vitro* ХГ независимо от дозы угнетает фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови и перитонеальных макрофагов. При оценке влияния ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов и макрофагов у неиммунизированных животных не обнаружено статистически значимых изменений. Однако на пике формирования гуморального иммунного ответа ХГ независимо от дозы активизирует фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов. Выявлена корреляционная зависимость между активацией фагоцитарной активности лейкоцитов и повышением уровня прогестерона.

Полученные результаты указывают, что, несмотря на самостоятельное фагоцит-депрессивное действие ХГ, индуцированный им синтез прогестерона способен активировать фагоциты только на фоне иммунизации. Гормонозависимая активация фагоцитов периферической крови и перитонеальной полости может служить одним из механизмов защиты плода от возможных патогенов, определяя высокий уровень системы естественного иммунитета в целом.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, фагоцитарная активность лейкоцитов, гуморальный иммунитет.

Experiments on male Swiss mice studied the effect of chorionic gonadotropin (CG) on the phagocytic activity of peripheral leukocytes and peritoneal macrophages, by taking into account the stages of formation of a humoral immune response. The administration of CG was found to stimulate the splenic production of antibody-forming cells (AFC) and to elevate the serum level of endogenous progesterone (Pr) in the mice. Irrespective of the dose, CG suppressed the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils and peritoneal macrophages in the *in vitro* system. Evaluation of the effect of CG on the phagocytic activity of leukocytes and macrophages revealed no statistically significant changes in nonimmunized animals. Whatever the dose was, CG, however, enhanced the phagocytic activity of neutrophils and macrophages at the peak of formation of a humoral immune response. A correlation was established between the phagocytic activity of leukocytes and the elevated level of Pr.

The findings indicate that despite the intrinsic phagocyte-depressive effect of CG, its induced Pr synthesis can activate phagocytes only during immunization. Hormone-dependent activation of phagocytes of peripheral blood and peritoneal cavity can be one of the mechanisms responsible for fetal protection from possible pathogens, by determining the high level of the natural immunity system as a whole.

Key words: chorionic gonadotropin, phagocytic activity of leukocytes, humoral immunity.

Процесс беременности — от оплодотворения до рождения ребенка — можно назвать феноменом естественной аллотрансплантации, поскольку геном развивающегося в организме матери плода наполовину заимствован у отца [7]. Однако при физиологически протекающей беременности отторжения генетически чужеродного трансплантата не происходит. Основной гормон беременности — хорионический гонадотропин (ХГ) — обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, защищая

зародыш от агрессии иммунокомпетентных клеток матери [1, 8]. Помимо этого, ХГ стимулирует секрецию прогестерона и эстрадиола, которые оказывают самостоятельное иммуномодулирующее действие [11]. В период беременности супрессия адаптивного иммунного ответа матери компенсируется активацией системы естественного иммунитета [9, 10]. Основными клетками, определяющими функционирование данной системы, являются моноциты и макрофаги. Во время беременности в матке и

децидуальной оболочке содержится большое количество макрофагов, численность которых регулируется плацентарными гормонами [9]. Показано, что ХГ участвует в контроле функциональной активности интактных моноцитов и гранулоцитов [13], однако гормоноопосредованное действие на фагоциты в условиях формирования гуморального иммунного ответа до сих пор не исследовали. С учетом различной чувствительности интактных фагоцитов и антигенактивированных клеток к регуляторному воздействию гормонов, оценка регуляторных эффектов ХГ на фагоциты при формировании первичного гуморального иммунного ответа является более адекватной и актуальной.

Цель работы — изучение эффектов ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов в период формирования первичного гуморального иммунного ответа.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на половозрелых самках мышей породы Swiss массой 20—22 г в несколько этапов. На первом этапе *in vitro* исследовали непосредственное действие ХГ ("Profasi", Serano, Италия) на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и клеток перитонеальной полости. Периферическую кровь получали при декантации интактных самок мышей с добавлением гепарина (25 ЕД/мл). Перитонеальные макрофаги выделяли по стандартной методике с использованием среды 199 [4]. Концентрацию клеток в культуре перитонеальных макрофагов доводили до $2 \cdot 10^6$ /мл, а для исследования фагоцитарной активности лейкоцитов использовали цельную кровь. ХГ применяли в дозах 100 и 10 МЕ/мл, рассчитанных на основании средних концентраций гормона в сыворотке крови беременных женщин в I и II—III триместрах соответственно [3]. Вся работа проводилась в пластиковых микропробирках с антиадгезивным покрытием.

Цельную периферическую кровь и перитонеальные макрофаги инкубировали в течение 1 ч в термостате при 37°C в присутствии ХГ, после чего исследовали фагоцитарную активность клеток модифицированным методом Каплина, основанным на поглощении формализированных эритроцитов барана (ФЭБ) в концентрации 10^8 /мл [5]. В пробирках смешивали 0,1 мл цельной гепаринизированной крови или клеток перитонеальной полости и 0,1 мл ФЭБ. Пробы инкубировали 20 мин при 37°C, затем содержимое пробирок ресуспендировали и готовили мазки, которые фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому—Гимзе. При визуализации мазков рассчитывали: процент фагоцитоза (ПФ) — количество фагоцитирующих лейкоцитов на 300 подсчитанных фагоцитов; индекс фагоцитоза (ИФ) — количество объектов фагоцитоза, захваченных одним фагоцитом; фагоцитарное число (ФЧ) — количество объектов фагоцитоза, которое приходится на 1 из 300 подсчитанных фагоцитов. Указанные показатели определяли отдельно для моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов

периферической крови и перитонеальных макрофагов.

На втором этапе эксперимента исследовали эффекты ХГ на фагоцитирующие клетки крови и перитонеальной полости *in vivo*. Для этого мышам вводили ХГ подкожно 3 инъекции через день в дозах, аналогичных тем, которые использовали в эксперименте *in vitro*, пересчитанных на объем крови экспериментального животного (200 и 20 МЕ/мышь). Контрольным животным инъецировали официальный растворитель гормона (0,9% NaCl). Фагоцитарную активность лейкоцитов крови и перитонеальной полости определяли вышеописанным методом.

На третьем этапе исследовали влияние ХГ на фагоциты периферической крови и перитонеальной полости в условиях формирования первичного гуморального иммунного ответа. Для этого животных иммунизировали внутрибрюшинно эритроцитами барана (10^8 /мл) и через 5 дней регистрировали антителообразующие клетки (АОК) в селезенке прямым методом локального гемолиза в геле [12] и одновременно определяли фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов [5]. ХГ инъецировали в дозах 200 и 20 МЕ/мышь с учетом этапов формирования гуморального иммунного ответа. С целью оценки влияния ХГ на антигеннезависимый этап дифференцировки иммунокомпетентных клеток гормон вводили до иммунизации в количестве 3 инъекций через день, а для исследования его действия только на антигензависимый этап — 3 раза через день начиная со дня иммунизации и вплоть до забоя.

Для оценки гонадотропного действия ХГ в сыворотке крови мышей определяли уровни эстрадиола ("Dia. Metra S.r.l.", Италия) и прогестерона ("Хема-Медика", Россия) иммуноферментным методом. Учет результатов вели с помощью планшетного анализатора "Bionhit" BP 800 при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку осуществляли непараметрическим методом с использованием *U*-критерия Манна—Уитни, корреляционный анализ проводили по Спирмену [2].

Результаты и их обсуждение

При исследовании непосредственного влияния ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости *in vitro* гормон, независимо от дозы, статистически значимо угнетал количество и поглощательную активность фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также макрофагов перитонеальной полости и не влиял на фагоцитарную активность эозинофилов (табл. 1). В то время как в эксперименте *in vivo* на неиммунизированных животных ХГ не изменял фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости (табл. 2).

Введение ХГ животным как до, так и после иммунизации статистически значимо повышало уровень АОК в селезенке (рис. 1), что подтверждает

Таблица 1

Влияние ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов в системе *in vitro* (n = 10)

Показатель	Контроль	ХГ 10 МЕ	ХГ 100 МЕ
<i>Нейтрофилы периферической крови</i>			
ПФ	27,7 ± 1,76	19,4 ± 1,56*	21,1 ± 0,54*
ИФ	1,21 ± 0,02	1,21 ± 0,03	1,37 ± 0,07
ФЧ	0,34 ± 0,02	0,23 ± 0,02*	0,29 ± 0,02*
<i>Моноциты периферической крови</i>			
ПФ	60,5 ± 5,65	51,3 ± 6,08	37,8 ± 5,06*
ИФ	2,07 ± 0,07	1,94 ± 0,44	1,28 ± 0,22
ФЧ	1,41 ± 0,02	0,98 ± 0,23	0,48 ± 0,09
<i>Эозинофилы периферической крови</i>			
ПФ	35,6 ± 3,93	44,4 ± 3,93	43,9 ± 5,65
ИФ	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
ФЧ	0,36 ± 0,04	0,44 ± 0,04	0,28 ± 0,04
<i>Макрофаги перитонеальной полости</i>			
ПФ	73,6 ± 2,57	56,9 ± 1,79*	49,7 ± 4,60*
ИФ	1,86 ± 0,09	1,68 ± 0,03	1,64 ± 0,07
ФЧ	1,38 ± 0,10	0,95 ± 0,03*	0,83 ± 0,09*

Примечание. Здесь и в табл. 3 одна звездочка — $p < 0,05$ по отношению к контролю, две звездочки — $p < 0,05$ по отношению к низкой дозе гормона; n — число животных в группе.

ранее полученные нами данные [6]. Одновременная оценка процессов фагоцитоза показала, что на антигеннезависимом этапе формирования гуморального иммунного ответа высокая доза ХГ (200 МЕ/мышь) дает выраженный стимулирующий эффект на функциональную активность клеток неспецифической резистентности, повышая общую поглотительную активность и количество фагоцитирующих моноцитов периферической крови. На антигензависимом этапе формирования гуморального иммунного ответа ХГ также в дозе 200 МЕ/мышь увеличивает количество фагоцитирующих перитонеальных макрофагов и усиливает их

Таблица 2

Влияние ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов у неммунизированных животных *in vivo* (n = 10)

Показатель	Контроль	ХГ 20 МЕ	ХГ 200 МЕ
<i>Нейтрофилы периферической крови</i>			
ПФ	24,80 ± 2,34	28,64 ± 2,31	26,00 ± 2,23
ФЧ	0,41 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,41 ± 0,04
ИФ	1,59 ± 0,12	1,49 ± 0,04	1,53 ± 0,08
<i>Моноциты периферической крови</i>			
ПФ	38,80 ± 5,72	44,81 ± 4,55	34,02 ± 3,02
ФЧ	0,51 ± 0,12	0,60 ± 0,13	0,47 ± 0,08
ИФ	1,24 ± 0,17	1,25 ± 0,17	1,40 ± 0,21
<i>Эозинофилы периферической крови</i>			
ПФ	42,59 ± 5,46	35,93 ± 3,96	36,50 ± 3,99
ФЧ	0,43 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,42 ± 0,04
ИФ	1,00 ± 0,00	1,11 ± 0,11	1,20 ± 0,13
<i>Макрофаги перитонеальной полости</i>			
ПФ	50,11 ± 2,03	58,80 ± 4,15	57,05 ± 2,49
ФЧ	0,98 ± 0,05	1,15 ± 0,12	1,15 ± 0,08
ИФ	1,98 ± 0,10	1,93 ± 0,11	1,92 ± 0,06

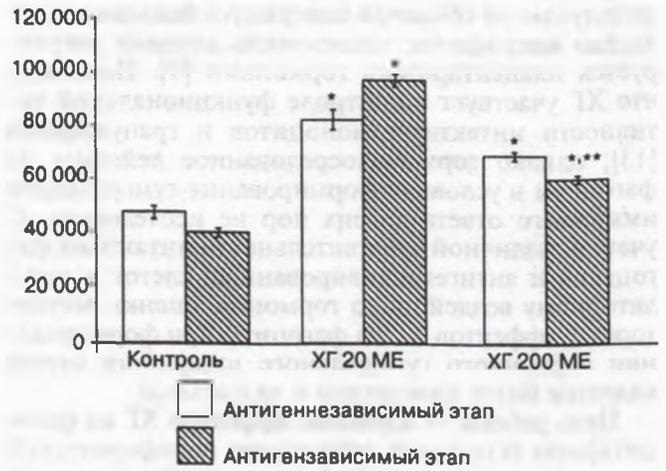


Рис. 1. Влияние ХГ на образование АОК на различных этапах формирования гуморального иммунного ответа.

Одна звездочка — $p < 0,05$ по отношению к контролю; две звездочки — $p < 0,05$ по отношению к низкой дозе гормона.

Таблица 3

Влияние ХГ на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости с учетом этапов формирования гуморального иммунного ответа (n = 10)

Показатель	Контроль	ХГ 20 МЕ	ХГ 200 МЕ
<i>Антигеннезависимый этап</i>			
<i>Нейтрофилы периферической крови</i>			
ПФ	21,87 ± 2,16	22,50 ± 2,29	22,90 ± 1,64
ФЧ	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,03
ИФ	1,44 ± 0,06	1,44 ± 0,09	1,43 ± 0,08
<i>Моноциты периферической крови</i>			
ПФ	39,47 ± 5,56	38,43 ± 5,58	60,2 ± 6,3* **
ФЧ	0,53 ± 0,04	0,52 ± 0,09	0,8 ± 0,09* **
ИФ	0,38 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,67 ± 0,12*
<i>Эозинофилы периферической крови</i>			
ПФ	37,88 ± 5,83	36,50 ± 3,99	52,00 ± 5,00**
ФЧ	0,38 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,67 ± 0,12
ИФ	1,00 ± 0,00	1,10 ± 0,10	1,23 ± 0,13
<i>Макрофаги перитонеальной полости</i>			
ПФ	76,34 ± 1,36	77,61 ± 1,48	77,65 ± 1,84
ФЧ	1,95 ± 0,09	2,23 ± 0,14	2,06 ± 0,13
ИФ	2,55 ± 0,10	2,86 ± 0,15	2,65 ± 0,16
<i>Антигензависимый этап</i>			
<i>Нейтрофилы периферической крови</i>			
ПФ	23,45 ± 1,87	31,2 ± 2,15*	27,90 ± 3,69
ФЧ	0,36 ± 0,04	0,51 ± 0,06*	0,42 ± 0,06
ИФ	1,51 ± 0,08	1,60 ± 0,07	1,49 ± 0,04
<i>Моноциты периферической крови</i>			
ПФ	37,34 ± 6,61	45,67 ± 4,19	38,04 ± 4,70
ФЧ	0,46 ± 0,10	0,48 ± 0,05	0,61 ± 0,15
ИФ	1,24 ± 0,20	1,05 ± 0,05	1,75 ± 0,59
<i>Эозинофилы периферической крови</i>			
ПФ	43,43 ± 5,05	44,17 ± 3,94	41,76 ± 6,06
ФЧ	0,43 ± 0,05	0,44 ± 0,04	0,47 ± 0,08
ИФ	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,10 ± 0,10
<i>Макрофаги перитонеальной полости</i>			
ПФ	60,80 ± 3,05	61,87 ± 3,24	68,7 ± 1,52*
ФЧ	1,64 ± 0,14	1,79 ± 0,18	2,13 ± 0,14*
ИФ	2,68 ± 0,15	2,84 ± 0,17	3,08 ± 0,15

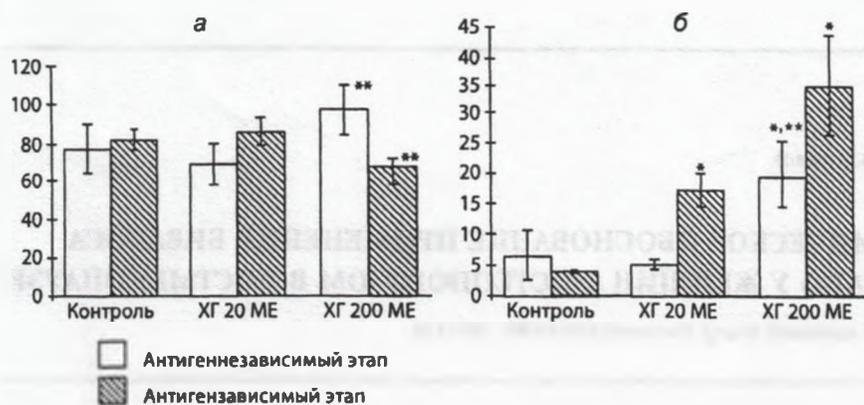


Рис. 2. Влияние ХГ на уровень половых стероидов.

а — влияние инъекций ХГ на уровень эстрадиола в сыворотке крови; б — влияние инъекций ХГ на уровень прогестерона в сыворотке крови

поглотительную способность, а доза 20 МЕ/мышь стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови (табл. 3).

Исследование уровня половых стероидов, индуцированных ХГ, показало, что инъекции гормона ни до (антигеннезависимый этап), ни после иммунизации (антигензависимый этап) не влияют на уровень эстрадиола, но статистически значимо повышают уровень прогестерона (рис. 2). В группе животных, получавших инъекции ХГ в дозе 200 МЕ/мышь, выявлена достоверная положительная корреляция между количеством фагоцитирующих перитонеальных макрофагов и концентрацией прогестерона в сыворотке крови ($R = 0,70$, $p < 0,05$). Таким образом, разнонаправленность эффектов ХГ в системе *in vitro* и *in vivo*, по всей вероятности, связана с гонадотропным действием гормона.

Анализируя полученные данные, можно говорить о сложном многокомпонентном контроле со стороны ХГ за функциональной активностью клеток неспецифической резистентности. Обладая выраженной фагоцит-депрессивной активностью *in vitro*, ХГ в условиях целостного организма либо не проявляет присущее ему действие, либо дает оппозитные стимулирующие эффекты. Если в первом случае иммунодепрессивную активность гонадотропина нивелируют индуцированные им половые стероиды, то во втором случае стимуляция фагоцитоза связана не только с повышением уровня эндогенных половых стероидов, но и с антигенной нагрузкой на иммунную систему. Необходимо подчеркнуть, что результатом гормонального действия является не изолированная активность ХГ и половых стероидов, а их комплексное воздействие на функциональную активность клеток-мишеней.

Исследования показали, что ХГ и активированный им синтез эндогенного прогестерона создают условия для преобладания гуморальных иммунных реакций и стимуляции фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости, что, по-видимому, спо-

собствует эффективной модуляции неспецифических защитных реакций организма при физиологически протекающей беременности. Кроме этого, гормонозависимая активация фагоцитов периферической крови и перитонеальной полости может служить одним из механизмов защиты плода от возможных патогенов, определяя высокий уровень системы естественного иммунитета в целом.

Выводы

1. *In vitro* ХГ угнетает фагоцитарную активность нейтрофилов, моноцитов периферической крови, а также перитонеальных макрофагов.
2. Инъекции ХГ неиммунизированным животным не влияют на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости.
3. Введение ХГ самкам мышей приводит к повышению уровня эндогенного прогестерона независимо от этапа дифференцировки иммунокомпетентных клеток.
4. На пике формирования гуморального иммунного ответа ХГ одновременно повышает уровень АОК в селезенке и стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости независимо от этапа дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баграмян Э. Р. // Акуш. и гин. — 1984. — № 4. — С. 8—12.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. — М., 1999.
3. Димитров Д. Я. Хориальный гонадотропин человека: Пер. с болг. — М., 1979.
4. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фриммеля: Пер. с нем. — М., 1987.
5. Каплин В. Н. Нетрадиционная иммунология инфекции. — Пермь, 1996.
6. Ширшев С. В. // Успехи соврем. биол. — 1998. — Т. 118, № 1. — С. 69—85.
7. Ширшев С. В. Механизмы иммунного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург, 1999.
8. Ширшев С. В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург, 2002. — Т. 1—2.
9. Alexander G., Zimmerman M., Lehmann R. et al. // *Domest. An. Endocrinol.* — 1998. — Vol. 15, N 15. — P. 377—387.
10. Abrahams V. M., Kim Y. M., Straszewski S. L. et al. // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 2004. — Vol. 51, N 4. — P. 275—282.
11. Albrecht E. D., Pepe G. J. // *Endocr. Rev.* — 1990. — Vol. 11. — P. 124—150.
12. Jerne N. K., Nordin A. A. // *Science.* — 1963. — Vol. 140. — P. 405—405.
13. Feinberg B. B., Anderson D. J., Steller M. A. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1994. — Vol. 78, N 3. — P. 586—591.

Поступила 24.05.06