

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СПЛЕНОЦИТОВ

Лаборатория иммунологии (зав. — проф. Н. Н. Кеворков) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

В системе сингенного переноса установлены избирательные иммуномодулирующие эффекты высокой (50 МЕ/мл) и низкой (10 МЕ/мл) доз хорионического гонадотропина (ХГ), затрагивающие функциональную активность А-клеток, Т- и В-лимфоцитов интактной селезенки. Инкубация в течение 1 ч нефракционированных спленоцитов с ХГ приводит к угнетению процессов формирования антителообразующих клеток (АОК) у летально облученных сингенных реципиентов. Удаление макрофагов из суспензии интактных спленоцитов снимает ХГ-наведенную иммуносупрессию, а в случае с низкой дозой активирует процессы формирования АОК. Внесение в клеточную культуру, обогащенную В-лимфоцитами, низкой дозы ХГ однозначно активирует процессы формирования АОК. Высокая доза гормона не дает подобного иммуностимулирующего эффекта, но селективно угнетает функцию Т-лимфоцитов, фракционированных методом фильтрации на нейлоновом волокне. Изучение функциональной активности А-клеток методом люминолзависимой хемилюминесценции показало, что ХГ в исследуемых дозах угнетает процессы генерации активных форм кислорода, таким образом определяя ключевую роль А-клеток как индукторов ХГ-зависимой иммуносупрессии в гетерогенной суспензии спленоцитов.

Selective immunomodulating effects of high (50 IU/ml) and low (10 IU/ml) doses of chorionic gonadotropin (CG) on the functional activity of A cells and intact splenic T and B lymphocytes were revealed for the syngeneic transfer system. One-hour incubation of nonfractionated splenocytes with CG suppressed the formation of antibody-producing cells (APC) in lethally irradiated syngeneic recipients. Removal of macrophages from the suspension of intact splenocytes arrested CG-induced immunosuppression and, in case of a low dose, activated the formation of APC. Addition of CG in a low dose to cell culture rich in B lymphocytes activated APC formation. A high dose of the hormone exerted no immunostimulating effect of this kind but selectively suppressed the function of T lymphocytes fractionated by filtration through nylon fiber filters. Study of the functional activity of A cells by luminol-dependent chemiluminescence showed CG in the studied doses to suppress the generation of active oxygen forms, thus determining the key role of A cells as inducers of CG-dependent immunosuppression in a heterogeneous suspension of splenocytes.

Хорионический гонадотропин (ХГ), синтез и динамика секреции которых прямо связаны с развитием беременности, способен в физиологических концентрациях эффективно контролировать иммунную систему матери [9, 14]. При этом уровень гормона, модулирующий иммунные реакции, совпадает по времени своего нарастания в крови с моментом появления чужеродных антигенных детерминант на клетках плода и внезародышевых оболочках [3].

Гуморальный иммунный ответ отражает функциональную активность всего спектра лимфоидных и макрофагальных клеток, которые благодаря тонкой системе субпопуляционных и популяционных взаимодействий определяют его уровень. Поэтому исследование иммунного ответа на фоне введения того или иного эндокринного фактора не позволяет судить о модулировании гормоном конкретных клеточных популяций, определяющих уровень ответа в целом.

Известно, что иммуномодулирующие эффекты ХГ зависят от дозы гормона и функциональной активности иммунокомпетентных клеток [1, 10]. Показана избирательность его иммунорегуляторных действий относительно Т-лимфоцитов-супрессоров [11] и В-клеток в системе *in vivo* [8]. Однако до сих пор не известно, какие популяции клеток интактной селезенки в большей степени подвержены иммуномодулирующему влиянию ХГ и как связан с этим механизм дозовой активности гормона.

Целью настоящего исследования было изучение способности физиологических концентраций ХГ

избирательно модулировать функциональную активность основных клеточных популяций селезенки, определяющих выраженность первичного иммунного ответа на тимусзависимый антиген.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышках-самках F₁(CBA×C57Bl/6) массой 20–22 г. ХГ (Profasi, "I. F. Serono S. p. A.", Италия) использовали в дозах 10 или 50 МЕ/мл, что соответствует концентрации гормона в крови беременной на протяжении II–III триместра или на 70-й день беременности (пик секреции) соответственно [16].

Клетки интактной селезенки инкубировали с ХГ в течение 1 ч при 37°C. Для этого спленоциты помещали в культуральные флаконы со средой 199 в концентрации $5 \cdot 10^6$ ядросодержащих клеток (ЯСК) в 1 мл. Количество спленоцитов в каждой отдельной культуре составляло $2 \cdot 10^7$ ЯСК.

Для оценки функциональной активности клеток селезенки использовали модель сингенного переноса. Реципиентов подвергали тотальному облучению в дозе 219,3 мКл/кг на установке РУМ-17. Иммунокомпетентные клетки или отдельные фракции спленоцитов, предварительно подвергшихся воздействию ХГ в течение 1 ч *in vitro*, концентрировали так, чтобы количество клеток, находящихся в 1 культуре, трансплантировали 1 реципиенту. Суспензию антигена (эритроциты барана $2 \cdot 10^8/0,2$ мл) и исследуемые клетки внутривенно инъецировали реципиентам в 1 шприце. На 5-е

сутки от момента переноса клеток мышей забивали, у них определяли количество антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в геле агарозы [12].

Для выделения Т-лимфоцитов использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату ("Нитрон") [13]. Как правило, в элюате содержалось 70–75% Т-лимфоцитов и 1–6% В-лимфоцитов. Для выделения В-лимфоцитов применяли реакцию комплементзависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксических сывороток использовали моноклональные антитела к Thy1,2-антигенов мыши ("Диа-М", Москва). При тестировании фракционированной суспензии 60–80% клеток были представлены ЕАС-розеткообразующими (В-лимфоциты) и 0–2% несли Thy1,2-маркеры.

Функциональную активность Т- или В-лимфоцитов селезенки оценивали по эффекту кооперации, инъецируя 1 реципиенту (1:1) преобразованные Т- или В-лимфоциты с интактными В- или Т-клетками соответственно.

Удаление макрофагов из суспензии проводили методом активной адгезии на стеклянной поверхности [2]. Для определения функциональной активности фагоцитирующих клеток использовали хемилюминесцентный метод [6]. В качестве красителя применяли люминол ("Serva"). Интенсивность светового потока регистрировали с помощью биоломинометра БЛМ-8703М. Каждую пробу оценивали в триплетах. Результаты выражали в абсолютных единицах: квантах в секунду. Поскольку все исследования проводили на интактных спленоцитах, изучали только фоновую хемилюминесценцию. Световой поток регистрировали на 1, 5, 8-й минутах.

Все полученные результаты сравнивали с контролем (интактные спленоциты, инкубируемые в культурах без добавок).

Статистическую обработку результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента [5]. Во всех расчетах оперировали $\log_{10} (lg)$ числа АОК.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, воздействие ХГ на гетерогенную популяцию спленоцитов до их контакта с антигеном вдвое снижает способность клеток формировать адаптивный иммунный ответ. После удаления из селезеночной суспензии адгезирующих клеток (А-клетки или макрофаги) способность спленоцитов формировать АОК резко снижается, что подтверждает эффективность проведенной селекции [2]. ХГ в данной суспензии теряет способность к иммунодепрессии и меняет направленность своих эффектов, активируя процессы формирования АОК (низкая доза).

Инкубация в течение 1 ч низкой дозы ХГ с клеточной суспензией, обогащенной В-лимфоцитами, приводит к двукратному приросту числа АОК, в то время как в высокой дозе гормон не дает значимых эффектов (см. табл. 1). При взаимодействии гормона с популяцией Т-клеток интактной селезенки ХГ, напротив, в высокой дозе угнетает, а в низкой не влияет на способность предшественников Т-лимфоцитов-хелперов формировать адаптивный иммунный ответ (см. табл. 1).

По-видимому, иммуностимулирующий эффект низкой дозы ХГ непосредственно связан с активацией В-лимфоцитов, находящихся на этапе антигеннезависимой дифференцировки. Аналогичное действие низкой дозы гормона зафиксировано нами ранее в экспериментальной системе *in vivo* [8]. Макрофаги не только препятствуют, но и меняют направленность модулирующих эффектов низкой дозы ХГ. Очевидно, А-клетки выполняют роль "дирижера наивных" лимфоцитов, действие которого под влиянием ХГ направлено на иммуносупрессию. Эти данные также согласуются с результатами других исследователей [15], которые показали, что удаление моноцитов из культуры клеток периферической крови человека существенно снижает супрессорный эффект ХГ в реакции бластной трансформации. В высокой концентрации гормон не способен активировать В-лимфоциты, но достоверно угнетает функциональную активность Т-клеток.

Таблица 1

Влияние ХГ на функциональную активность отдельных популяций спленоцитов, реализующих адаптивный иммунный ответ ($M \pm m$)

№ п/п	Экспериментальное воздействие	Число мышей	lg АОК/2 · 10 ⁷ ЯСК	Достоверность различий
1	Контроль (нефракционированные клетки)	40	3,237 ± 0,033 (1926,5)	
2	ХГ (10 МЕ/мл)	8	2,893 ± 0,103 (947,5)	$p_{2-1} < 0,002$
3	ХГ (50 МЕ/мл)	12	2,949 ± 0,047 (950,0)	$p_{3-1} < 0,001$ $p_{3-2} > 0,05$
4	Контроль (спленоциты, лишённые А-клеток)	34	2,623 ± 0,034 (467,0)	$p_{4-1} < 0,001$
5	ХГ (10 МЕ/мл)	16	2,769 ± 0,052 (655,0)	$p_{5-4} < 0,01$
6	ХГ (50 МЕ/мл)	13	2,570 ± 0,060 (415,3)	$p_{6-4} > 0,05$ $p_{6-5} < 0,02$
7	Контроль (Т-лимфоциты + В-лимфоциты — 1:1)	9	3,187 ± 0,063 (1666,6)	$p_{7-1} > 0,05$
8	Т-лимфоциты + В-лимфоциты, обработанные ХГ (10 МЕ/мл)	9	3,483 ± 0,044 (3173,3)	$p_{8-7} < 0,002$
9	Т-лимфоциты + В-лимфоциты, обработанные ХГ (50 МЕ/мл)	11	3,148 ± 0,087 (1810,9)	$p_{9-7} > 0,05$ $p_{9-8} < 0,01$
10	В-лимфоциты + Т-лимфоциты, обработанные ХГ (10 МЕ/мл)	11	3,218 ± 0,034 (1716,6)	$p_{10-7} > 0,05$
11	В-лимфоциты + Т-лимфоциты, обработанные ХГ (50 МЕ/мл)	12	2,953 ± 0,063 (1000,0)	$p_{11-7} < 0,02$ $p_{11-10} < 0,01$

Таким образом, доза ХГ играет решающую роль в модуляции функциональной активности интактных спленоцитов только при условии отсутствия А-клеток. Если макрофаги находятся в суспензии — высокая и низкая дозы ХГ индуцируют иммуносупрессивные эффекты, если отсутствуют — доза 10 МЕ/мл активирует В-лимфоциты, а доза 50 МЕ/мл угнетает Т-клетки.

Поскольку для иммунорегулирующих эффектов ХГ макрофаги являются ключевыми, важно было оценить способность гормона непосредственно влиять на функциональную активность данных клеток. Известно, что одним из основных механизмов внутриклеточной деградации антигенного материала, подвергнутого фагоцитозу, является каскад ферментативных реакций, генерирующих разнообразные формы активного кислорода с высоким окислительным потенциалом [4, 7].

Как видно из табл. 2, инкубация ХГ в течение 1 ч в исследуемых дозах приводит к выраженному снижению фоновой хемилюминесценции спленоцитов, определяемой А-клетками (в предварительных экспериментах установлено, что активная адгезия спленоцитов на стеклянную поверхность лишает суспензию клеток селезенки возможности генерировать активный кислород, так как средний фоновый уровень свечения самого люминола был выше уровня, регистрируемого при внесении фракционированных клеток). Эффект ХГ не носит дозовой зависимости и, по-видимому, реализуется на уровне межклеточного обмена А-клеток, так как на протяжении исследуемого времени, начиная с 1-й минуты, степень депрессии практически не меняется, в то время как у контрольных культур клеток за аналогичный период наблюдаются значительные колебания (см. табл. 2).

Таким образом, можно говорить о способности ХГ прямо воздействовать на интактные макрофаги селезенки, угнетая их функциональную активность на уровне ферментных систем, генерирующих активные формы кислорода.

Суммируя представленный материал, необходимо отметить следующие основные моменты. Во-первых, ХГ в дозе, экстраполированной со среднего уровня в периферической крови беременных во II—III триместре, разнонаправленно модулирует функциональную активность интактных спленоцитов. Феномен разнонаправленности зависит от клеточного состава. Присутствие в суспензии макрофагов определяет иммуносупрессивное дей-

ствие ХГ, что может быть связано с непосредственным угнетением эффекторных функций А-клеток, ассоциированных с формированием кислородзависимых механизмов резистентности. Взаимодействие низкой дозы ХГ с макрофагами не только снижает их эффекторный потенциал, но и побуждает эти клетки угнетать гормонзависимую активацию интактных В-лимфоцитов.

Во-вторых, высокая доза ХГ, отражающая концентрацию гормона в конце I триместра, реализует только иммуносупрессивные эффекты. Однако элиминация макрофагов нивелирует ХГ-зависимую иммунодепрессию, несмотря на то, что гормон способен угнетать функциональную активность интактных Т-лимфоцитов. По-видимому, механизм иммуносупрессивного действия высокой дозы гормона зависит от соотношения и уровня А-клеток и Т-лимфоцитов, что определяет либо макрофагзависимую, либо макрофагnezависимую (непосредственное угнетение Т-лимфоцитов) депрессию иммунокомпетентных клеток.

Выводы

1. ХГ в дозах, отражающих его уровень во время беременности, существенно угнетает процессы свободнорадикального окисления А-клеток интактной селезеночной суспензии.

2. Инкубация ХГ в течение 1 ч с интактными спленоцитами *in vitro* вдвое снижает их способность формировать АОК к тимусзависимому антигену.

3. Удаление из суспензии интактных спленоцитов А-клеток нивелирует иммунодепрессию, наводимую как высокой (50 МЕ/мл), так и низкой (10 МЕ/мл) дозами ХГ. Одновременно для низкой концентрации гормона отсутствие А-клеток является необходимым условием, позволяющим реализовать иммуностимулирующие эффекты.

4. Иммуностимулирующий эффект низкой дозы ХГ прямо связан с активированием интактных В-лимфоцитов, а высокой дозы — с угнетением функциональной активности Т-клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахметьев Б. А., Ширшев С. В., Гусев Е. Ю. // Деп. в ВИНТИ, № 8897-В87.
- Дерфлинг П., Вишер З. // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля: Пер. с нем. — М., 1987. — С. 373—378.
- Димитров Д. Я. Хориальный гонадотропин человека: Пер. с болг. — М., 1979.
- Маянский Д. Н. Хроническое воспаление. — М., 1991.
- Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М., 1980.
- Пыцкий В. И., Филатов О. Ю. // Бюл. exper. биол. — 1994. — № 3. — С. 299—301.
- Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов. — М., 1984.
- Ширшев С. В. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 2. — С. 181—183.
- Ширшев С. В., Кеворков Н. Н. // Успехи соврем. биол. — 1991. — Т. 111, № 5. — С. 683—697.
- Ширшев С. В., Кеворков Н. Н. // Пробл. эндокринологии. — 1993. — № 1. — С. 54—57.
- Ширшев С. В. // Биохимия. — 1995. — Т. 60, № 11. — С. 1765—1774.
- Jerne N. K., Nordin A. A. // Science. — 1963. — Vol. 140, N 3366. — P. 405.
- Julius E. L., Simpson J., Herzenberg L. // Eur. J. Immunol. — 1973. — Vol. 3. — P. 646—648.
- Kevorkov N. N., Shilov Ju. I., Shirshov S. V. // Brain Behav. Immun. — 1991. — Vol. 5. — P. 149—161.
- Ricketts R. M., Jones D. B. // J. Reprod. Immunol. — 1985. — Vol. 7, N 3. — P. 225—232.
- Wide L. // Acta endocrinol. — 1962. — Suppl. 70. — P. 1—100.

Поступила 04.11.96

Таблица 2

Влияние ХГ на лимфоцитозависимую хемилюминесценцию интактных спленоцитов ($M \pm m$)

№ п/п	Число проб	Экспериментальное воздействие	Интенсивность светового потока, квант/с (10^5 клеток)	Достоверность различий
<i>1-я минута</i>				
1	23	Контроль	197,52 $\pm$ 53,94	
2	22	ХГ (10 МЕ/мл)	22,93 $\pm$ 2,89	$p_{2-1} < 0,002$
3	30	ХГ (50 МЕ/мл)	36,62 $\pm$ 7,78	$p_{3-1} < 0,01$
<i>5-я минута</i>				
4	12	Контроль	104,3 $\pm$ 46,27	
5	28	ХГ (10 МЕ/мл)	27,82 $\pm$ 3,58	$p_{5-4} > 0,05$
6	27	ХГ (50 МЕ/мл)	26,55 $\pm$ 4,51	$p_{6-4} > 0,05$
<i>8-я минута</i>				
7	19	Контроль	166,51 $\pm$ 49,51	
8	31	ХГ (10 МЕ/мл)	26,33 $\pm$ 4,23	$p_{8-7} < 0,01$
9	24	ХГ (50 МЕ/мл)	26,62 $\pm$ 3,56	$p_{9-7} < 0,01$