

© С. В. ШИРШЕВ, О. Г. ЛЯЛИНА, 2003

УДК 612.112.94/95:612.649.018].083

С. В. Ширшев, О. Г. Лялина

РЕГУЛЯЦИЯ ХОРИОНИЧЕСКИМ ГОНАДОТРОПИНОМ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛИЯ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА; РОЛЬ ФАЗ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

Лаборатория экологической генетики микроорганизмов (зав. — проф. С. В. Ширшев) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

Исследовано влияние хорионического гонадотропина (ХГ) на внутриклеточное содержание ионов калия ($[K^+]_i$) в иммунокомпетентных клетках периферической крови человека с учетом фаз менструального цикла. ХГ использовался в дозах 10, 50 и 100 МЕ/мл. Уровень $[K^+]_i$ определяли методом пламенной фотометрии во фракционированных моноцитах и лимфоцитах периферической крови мужчин, а также женщин, находящихся в поздней фолликулярной и лютеиновой фазах менструального цикла. Установлено, что ХГ в дозе 100 МЕ/мл снижает уровень $[K^+]_i$ в моноцитах и лимфоцитах мужчин, а в дозе 50 МЕ/мл — и в лимфоцитах женщин, находящихся в лютеиновой фазе менструального цикла. Под действием высоких доз гормона уровень $[K^+]_i$ стабилизируется в обоих типах клеток женщин, находящихся в фолликулярной фазе. Сделан вывод, что ХГ способен модулировать уровень $[K^+]_i$ в иммунокомпетентных клетках периферической крови человека, а направленность его эффектов зависит от типа гормонакцептирующих клеток и определяется фазой менструального цикла.

The effect of chorionic gonadotropin (CG) on intracellular potassium ion ($[K^+]_i$) levels in human blood immunocompetent cells was studied by taking into account the phases of a menstrual cycle. CG was used in doses of 10, 50, and 100 IU/ml. Plasma photometry was used to measure the level of $[K^+]_i$ in the fractionated peripheral monocytes and lymphocytes from males, as well as from females in the late follicular and luteal phases of a menstrual cycle. CG used in a dose of 100 IU/ml was found to lower $[K^+]_i$ in the monocytes and lymphocytes of males and in a dose of 50 IU in the lymphocytes of females in the luteal phase of a menstrual cycle. The hormone used in large doses stabilized the level of $[K^+]_i$ in both types of cell of female in the follicular phase. It is concluded that CG can modulate the level of $[K^+]_i$ in human peripheral blood immunocompetent cells, and the directionality of its effects depends on a type of hormone-accepting cells and it is determined by a menstrual phase.

Во время беременности, помимо гормональных перестроек, в организме матери происходят существенные изменения иммунной системы [6]. В связи с тем что клетки плода экспрессируют на своей поверхности антигены отцовского гаплотипа, они как генетически чужеродные одновременно являются потенциальной мишенью для цитотоксического ответа со стороны иммунной системы матери. Однако этого не происходит отчасти благодаря синтезу ряда плацентарных гормонов [1]. Наиболее важным гормоном, определяющим развитие беременности и контролирующим синтез половых стероидов, является хорионический гонадотропин (ХГ). Этот гликопротеин продуцируется главным образом синцитиотрофобластом плаценты и обладает широким спектром действия как на репродуктивные ткани [9], так и на клетки иммунной системы [1, 5]. Ранее показано, что молекулярные механизмы внутриклеточной трансдукции гормонального сигнала на уровне иммунокомпетентных клеток реализуются через сАМР-и Ca^{2+} -зависимые пути [5]. Известно, что эти системы участвуют и в регуляции K^+ -гомеостаза клетки, который является ключевым фактором активации и пролиферации лейкоцитов [8, 12]. Функционирование различных K^+ -каналов, определяющих уровень внутриклеточного содержания K^+ ($[K^+]_i$), подвержено влиянию половых стероидных гормонов [10], которые способны регулировать иммуномодулирующие эффекты ХГ [5]. Уровни половых стероидов в крови различаются в течение менструального цикла: эстрогены преобладают в фолликулярной (эстрогендо-

минантной) фазе, прогестины — в лютеиновой (прогестерондоминантной) фазе. Поскольку известно, что направленность иммуномодулирующих эффектов ХГ определяется половыми стероидами и типом гормонакцептирующих клеток [5], необходимо учитывать обе эти составляющие.

Целью данной работы была оценка влияния ХГ на уровень $[K^+]_i$ в различных по функциональной значимости иммунокомпетентных клетках периферической крови человека с учетом фаз менструального цикла.

Материалы и методы

В работе использовали клетки периферической крови здоровых доноров: женщин, находящихся в поздней фолликулярной (эстрогендоминантной) и поздней лютеиновой (прогестерондоминантной) фазах менструального цикла, и мужчин (контрольная группа). Мононуклеары выделяли на градиенте плотности фиколла—верографина (1,077 г/мл), после чего моноциты и лимфоциты подвергали фракционированию. Для этого суспензию после двойной отмывки питательной средой 199 ("Биомед", Россия) помещали на стеклянные чашки Петри ("Anumbra") с 5% эмбриональной телячьей сывороткой ("Sigma", США) и инкубировали 45 мин при 37°C. Затем фракцию, обогащенную лимфоцитами, сливали, а прилипшие моноциты снимали с помощью резинового шпателя. Фракционированные клетки двукратно отмывали в среде 199 и инкубировали 45 мин при 4°C для стабилизации мембранных структур. Чистота выделения моноцитов по

оценке иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител к CD14 (Primary Anti-Human CD14; clone 2C-15C, ICN, США) составляла 78—85%. Чистота выделения лимфоцитов оценивалась при подсчете мазков, окрашенных азуром и эозином, и составляла 85—90%. Сепарированные таким образом моноциты и лимфоциты в концентрации $2 \cdot 10^6$ в 1 мл преинкубировали с ХГ ("Profasi Serono", Италия) в течение 10, 30 и 60 мин при 37°C. Гормон использовали в концентрациях 10, 50 и 100 МЕ/мл, соответствующих его физиологическим уровням в крови во время беременности [2]. Затем для определения уровня $[K^+]_i$ клетки отмывали в инкубационной среде 199 и холодном изотоническом растворе $MgCl_2$ (95 мМ), пермеабелизировали 1% тритоном X-100 ("Serva", США) и осаждали центрифугированием [13]. Уровень $[K^+]_i$ в клеточных супернатантах определяли на пламенном фотометре ФПЛ-1 (Россия), результаты выражали в микромолях на 10^6 клеток. Жизнеспособность фракционированных клеток, которую оценивали на каждом этапе эксперимента в тесте с эозином, составляла 95—98%. Статистическую обработку результатов после предварительной оценки распределения проводили с использованием критерия U Манна—Уитни — пакет Statistica (Stat Soft, США, 1999). За статистически значимые принимали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В динамике 60-минутного культивирования интактных моноцитов выявлено статистически значимое снижение уровня $[K^+]_i$ в клетках женщин, находящихся в фолликулярной фазе менструального цикла, тогда как в клетках женщин, находящихся в лютеиновой фазе, и в клетках мужчин уровень

$[K^+]_i$ существенно не изменялся (табл. 1). Таким образом, уровень $[K^+]_i$ в интактных клетках, по-видимому, в определенной степени зависит от уровня половых стероидных гормонов.

При внесении ХГ в культуру моноцитов мужчин эффект вызывает только высокая доза гормона (100 МЕ/мл), которая индуцирует значимое снижение уровня $[K^+]_i$ к 30-й минуте культивирования по отношению к 10-й минуте, а также относительно дозы 50 МЕ/мл. В клетках женщин, находящихся в фолликулярной фазе менструального цикла, высокие дозы гормона не вызывают подобного эффекта, но стабилизируют уровень $[K^+]_i$ относительно контроля в динамике культивирования. При инкубации с ХГ моноцитов женщин, находящихся в лютеиновой фазе цикла, гормон не оказывает модулирующего влияния на уровень $[K^+]_i$ (см. табл. 1).

Известно, что при рецепции ХГ клетками Лейдига повышается уровень внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и включаются Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, что приводит к выходу K^+ из клетки [7]. Также при увеличении уровня $[Ca^{2+}]_i$ в человеческих макрофагах активируются Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, определяющие выход ионов K^+ [11]. Возможно, подобный механизм действия ХГ реализуется и в моноцитах периферической крови мужчин. Поскольку функциональная активность моноцитов во многом зависит от деятельности Ca^{2+} -активируемых, потенциалзависимых и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, определяющих уровень $[K^+]_i$ в клетках [3], его снижение под воздействием ХГ может служить одним из механизмов, с помощью которого гормон регулирует активность фагоцитов. Разнонаправленность действия ХГ на уровень $[K^+]_i$ в женских клетках в зависимости от фазы менстру-

Таблица 1

Влияние ХГ на уровень $[K^+]_i$ (в мкМ на 10^6 клеток) в моноцитах периферической крови человека ($M \pm m$)

Экспериментальное воздействие	Группа обследованных	Продолжительность инкубации, мин		
		10	30	60
Растворитель гормона (контроль)	Мужчины ($n = 12$)	$7,69 \pm 0,971$	$6,12 \pm 0,971$	$6,66 \pm 1,013$
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		$8,51 \pm 1,115$	$6,37 \pm 1,223$	$7,62 \pm 1,741$
50		$9,16 \pm 1,245$	$8,22 \pm 1,450$	$4,66 \pm 0,333$
100		$8,49 \pm 1,246$	$4,16 \pm 0,166^{a, b}$	$4,76 \pm 0,766$
Растворитель гормона (контроль)	Женщины, фолликулярная фаза цикла ($n = 12$)	$12,15 \pm 1,187$	$8,51 \pm 1,055$	$7,66 \pm 0,932^a$
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		$15,20 \pm 1,202^a$	$12,16 \pm 1,578$	$8,66 \pm 1,404^a$
50		$13,12 \pm 1,641$	$9,80 \pm 1,396$	$10,00 \pm 0,666$
100		$12,25 \pm 1,344$	$10,66 \pm 1,715$	$10,62 \pm 1,308$
Растворитель гормона (контроль)	Женщины, лютеиновая фаза цикла ($n = 12$)	$5,40 \pm 0,375$	$7,54 \pm 1,568$	$8,41 \pm 1,819$
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		$6,50 \pm 1,151$	$9,58 \pm 1,959$	$7,52 \pm 1,702$
50		$7,81 \pm 1,628$	$7,23 \pm 1,554$	$7,92 \pm 1,422$
100		$7,66 \pm 1,666$	$6,53 \pm 0,757$	$7,28 \pm 0,750$

Примечание. Здесь и в табл. 2: n — число исследований; значимые различия: а — по сравнению с 10-й минутой инкубации; б — по сравнению с предыдущей дозой ХГ; в — по сравнению с соответствующим контролем.

ального цикла скорее всего связана с уровнем половых стероидов, доминирующих в каждой фазе. По-видимому, в моноцитах женщин поздней фолликулярной фазы цикла эстрогены и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) способствуют стабилизации уровня $[K^+]_i$ под действием ХГ, тогда как в моноцитах лютеиновой фазы под действием прогестерона эффекты ХГ трансформируются.

В условиях 60-минутного культивирования интактных лимфоцитов уровень $[K^+]_i$ значительно снижается в клетках женщин, находящихся в фолликулярной фазе овариального цикла, тогда как в лимфоцитах женщин, находящихся в лютеиновой фазе, и в клетках мужчин уровень $[K^+]_i$ остается неизменным (табл. 2). Таким образом, изменения уровня $[K^+]_i$ в лимфоцитах периферической крови имеют тот же характер, что и в моноцитах, и также подвержены влиянию половых стероидных гормонов.

В лимфоцитах мужчин, как и в моноцитах, эффект вызывает только высокая доза ХГ (100 МЕ/мл), под действием которой уровень $[K^+]_i$ статистически значимо снижается к концу 60-минутной инкубации по отношению к 10-й минуте. В лимфоцитах женщин, находящихся в фолликулярной фазе овариального цикла, гормон стабилизирует уровень $[K^+]_i$ в динамике культивирования только в дозе 50 МЕ/мл. При этом, хотя динамика изменений уровня $[K^+]_i$ под действием дозы 10 МЕ/мл не отличалась от таковой в группе сравнения, этот показатель на 60-й минуте культивирования был значимо выше контрольного (см. табл. 2). В культуре лимфоцитов женщин, находящихся в лютеиновой фазе цикла, на 30-й минуте культивирования ХГ в дозе 50 МЕ/мл статистически значимо снижает уровень $[K^+]_i$ относительно контроля. К концу инкубации данный эффект не наблюдается, но фиксируются

статистически значимые различия уровней $[K^+]_i$ при исследованных дозах гормона (см. табл. 2).

Таким образом, способность ХГ снижать уровень $[K^+]_i$, как в моноцитах, так и в лимфоцитах мужчин можно с определенной долей вероятности интерпретировать как самостоятельный, не зависящий от женских половых стероидных гормонов эффект ХГ. Ранее показано, что ХГ в высокой дозе способен угнетать функциональную активность Т-лимфоцитов, повышая внутриклеточные концентрации сАМР [4] и Ca^{2+} [4, 5]. Известно, что увеличение уровня сАМР способно активировать некоторые потенциалзависимые [15] и сАМР-чувствительные K^+ -каналы [14], а повышение уровня $[Ca^{2+}]_i$ — Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, что в совокупности и может обусловить снижение уровня $[K^+]_i$ в лимфоцитах мужчин под действием высокой дозы ХГ.

В лимфоцитах женщин, находящихся в эстрогендоминантной фазе овариального цикла, как и в моноцитах, K^+ -потенцирующий эффект гормона, по-видимому, обусловлен влиянием эстрогенов и ФСГ. Однако в лимфоцитах лютеиновой фазы в отличие от моноцитов эндокринный фон способствует ХГ-зависимому понижению уровня $[K^+]_i$.

Из литературы [10] известно, что прогестерон, доминирующий в лютеиновой фазе, обладает высокой аффинностью к Ca^{2+} -активируемым и потенциал-чувствительным K^+ -каналам Т-лимфоцитов и способен прямо и обратимо их блокировать, приводя к стабилизации уровня $[K^+]_i$. По-видимому, ХГ ослабляет K^+ -блокирующий эффект прогестерона, в результате чего уровень $[K^+]_i$ в лимфоцитах, оставаясь стабильным в динамике, снижается относительно контрольного уровня. Таким образом, ХГ и прогестерон выступают антагонистами на уровне системы K^+ -транспорта, поэтому в лю-

Таблица 2

Влияние ХГ на уровень $[K^+]_i$ (в мкМ на 10^6 клеток) в лимфоцитах периферической крови человека ($M \pm m$)

Экспериментальное воздействие	Группа обследованных	Продолжительность инкубации, мин		
		10	30	60
Растворитель гормона (контроль)	Мужчины ($n = 9$)	11,64 $\pm$ 0,933	8,25 $\pm$ 1,359	8,00 $\pm$ 1,341
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		10,66 $\pm$ 0,495	9,85 $\pm$ 1,334	7,66 $\pm$ 1,801
50		11,08 $\pm$ 0,548	8,82 $\pm$ 1,141	8,50 $\pm$ 2,125
100		12,10 $\pm$ 0,674	7,06 $\pm$ 1,234 ^a	6,00 $\pm$ 1,264 ^a
Растворитель гормона (контроль)	Женщины, фолликулярная фаза цикла ($n = 12$)	10,70 $\pm$ 1,033	10,80 $\pm$ 1,103	7,41 $\pm$ 0,679 ^{a, г}
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		11,16 $\pm$ 1,556	14,50 $\pm$ 1,463	10,25 $\pm$ 0,954 ^{a, б}
50		10,20 $\pm$ 0,918	12,30 $\pm$ 1,577	9,50 $\pm$ 1,011
100		12,83 $\pm$ 1,278	11,40 $\pm$ 0,881	8,71 $\pm$ 1,060 ^{a, г}
Растворитель гормона (контроль)	Женщины, лютеиновая фаза цикла ($n = 9$)	7,28 $\pm$ 1,637	10,20 $\pm$ 2,148	7,02 $\pm$ 1,204
Доза ХГ, МЕ/мл:				
10		8,26 $\pm$ 1,634	9,40 $\pm$ 1,833	7,40 $\pm$ 1,985
50		8,73 $\pm$ 2,130	4,80 $\pm$ 0,200 ^а	4,16 $\pm$ 0,166 ^б
100		7,66 $\pm$ 1,666	6,32 $\pm$ 0,492	7,62 $\pm$ 1,522 ^б

Примечание. г — различия по сравнению с 30-й минутой инкубации.

теиновой фазе ХГ не реализует свое собственное действие и препятствует проявлению эффекта половых стероидов.

Во время беременности ХГ угнетает иммунные реакции матери, направленные на отторжение полуаллогенного плода [1]. Поскольку трансдукция гормонального сигнала осуществляется с помощью аденилатциклазной и Ca^{2+} -зависимой систем вторичных мессенджеров [4, 5], связанных с K^+ -транспортом клеток [14], модуляция ХГ уровня $[\text{K}^+]_i$ в иммуноцитах, по-видимому, может быть еще одним механизмом реализации эффектов гормона. Половые стероиды, в частности прогестерон, обладающий при беременности, наряду с регуляцией других эффектов ХГ [5] — способны оказывать влияние и на K^+ -модулирующее действие гормона. Таким образом, регуляция ХГ уровня $[\text{K}^+]_i$ в иммунокомпетентных клетках может быть включена в спектр механизмов, обеспечивающих нормальное протекание беременности.

Выводы

1. ХГ способен модулировать уровень $[\text{K}^+]_i$ в митохондриальных клетках периферической крови человека только в высоких концентрациях (50–100 МЕ/мл) в зависимости от пола и фазы менструального цикла.

2. В моноцитах и лимфоцитах женщин, находящихся в фолликулярной фазе овариального цикла, ХГ в высоких концентрациях приводит к стабилизации уровня $[\text{K}^+]_i$ в динамике 60-минутного культивирования.

3. Инкубация *in vitro* лимфоцитов женщин, находящихся в лютеиновой фазе менструального

цикла, с ХГ (50 МЕ/мл) на 30-й минуте приводит к снижению уровня внутриклеточного K^+ .

4. В моноцитах и лимфоцитах мужчин высокая доза ХГ (100 МЕ/мл) снижает уровень $[\text{K}^+]_i$ в динамике 60-минутной инкубации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета / Кеворков Н. Н., Шилов Ю. И., Ширшев С. В., Черешнев В. А. — Екатеринбург, 1993.
2. Димитров Д. Я. Хориальный гонадотропин человека. — М., 1979.
3. Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. — СПб., 1998.
4. Ширшев С. В. // Биохимия. — 1997. — Т. 62, № 5. — С. 514–522.
5. Ширшев С. В. // Успехи соврем. биол. — 1998. — Т. 118, № 1. — С. 69–85.
6. Ширшев С. В. Механизмы иммунного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург, 1999.
7. Carnio E. C., Varanda W. A. // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1995. — Vol. 28, N 7. — P. 813–824.
8. Chandy K. G., DeCoursey T. E., Cahalan M. D. et al. // J. Exp. Med. — 1984. — Vol. 160. — P. 369–385.
9. Dufau M. L., Catt K. J. // Vitam. Horm. — 1978. — Vol. 36. — P. 461–470.
10. Ehring G. R., Kerschbaum H. H., Eder C. et al. // J. Exp. Med. — 1998. — Vol. 188. — P. 1593–1602.
11. Gallin E. K. // Am. J. Physiol. — 1989. — Vol. 257, N 1, Pt 1. — P. 77–85.
12. Jensen B. S., Odum N., Jorgensen N. K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 10917–10921.
13. Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. // Biochim. Biophys. Acta. — 1997. — Vol. 1368. — P. 61–72.
14. Oleson D. R., deFelice L. J., Quinn M. F., Donahoe R. M. // J. Immunol. — 1996. — Vol. 157, N 3. — P. 1080–1086.
15. Pahapill P. A., Schlichter L. C. // J. Physiol. — 1992. — Vol. 445. — P. 407–430.

Поступила 31.01.02

♦ В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616-006.488-07-08

И. И. Дедов, Н. С. Кузнецов, Д. Г. Бельцевич, Л. В. Куратев

40-ЛЕТНИЙ ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ХРОМАФФИННОЙ ТКАНИ

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Сосредоточение в рамках одного лечебного учреждения большого количества пациентов с опухолями хромаффинной ткани является большой редкостью. Это вызвано отсутствием узкоспециализированных хирургических отделений с возможностью концентрации данной категории больных. Наибольшее количество пациентов в изучаемых группах, за исключением современных межклинических исследований, колеблется от 150 до 200 [4, 11–13]. В Эндокринологическом научном центре РАМН с 1957 по 2000 г. было оперировано 512 больных с хромаффинными опухолями. На осно-

вании этого беспрецедентного опыта мы посчитали возможным предложить общему вниманию результаты данного исследования.

Феохромоцитома — опухоль, исходящая из хромаффинных клеток и секретирующая катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин). Популяционная распространенность заболевания составляет 1 на 200 тыс. населения, заболеваемость, по разным данным, — 1 случай на 1,5–2 млн населения в год [1, 2, 7].

Большинство анатомических структур, из которых происходит указанная опухоль, представлено