© С. В. ШИРШЕВ, 1995

УДК 615.357:577.175.327].015.46.07

С. В. Ширшев

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОСПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ-СУПРЕССОРОВ

Лаборатория иммунологии (зав. Н. Н. Кеворков) Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

В период физиологически протекающей беременности плацента секретирует целый спектр биологически важных соединений, среди которых на первом месте по значимости стоит хорионический гонадотропин (ХГ) [2, 6]. Основной эффект этого гормона связан с лютеопротекцией и перестройкой эндокринного статуса организма беременной женщины [5, 10]. Высокая иммунорегулирующая активность ХГ во многом определяет взаимоотношения между иммунокомпетентными клетками матери и несущими признаки чужеродной генетической информации клетками эмбриона и плаценты [4, 6]. Нарушение этих взаимоотношений, как правило, носит фатальный характер для гестационного процесса в целом.

Известно, что все эффекторные функции лимфоцитов находятся под контролем Т-лимфоцитов-супрессоров, уровень которых во время беременности существенно возрастает [4]. Ранее нами показана способность ХГ модулировать процессы генерации антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров в организме овариэктомированных и некастрированных мышей-самок [3].

Задачей настоящей работы являлось изучение влияния ХГ на способность уже сформированных антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров реализовать иммунодепрессивный потенциал в отношении антителообразующих клеток (АОК).

Материалы и методы

Эксперименты проведены на половозрелых инбредных мышах-самках линии CBA массой 20-22 г, полученных из питомника "Рапполово" РАМН. Части мышей проводили двустороннюю овариэктомию под эфирным наркозом. Овариэктомированных животных использовали спустя месяц после операции.

Антигеноспецифичные супрессоры индуцировали у интактных самок, инъецируя внутрибрюшинно $4 \cdot 10^9$ эритроцитов барана (ЭБ) или кролика (ЭК). Через 14 сут мышей забивали и выделяли клетки селезенки, где к этому времени накапливаются антигеноспецифичные Т-лимфоциты-супрессоры [12]. Затем спленоциты переносили внутривенно сингенным реципиентам в концентрации $5 \cdot 10^7$ ядросодержащих клеток (ЯСК) и одновременно иммунизировали ЭБ ($2 \cdot 10^8$). В качестве реципиентов использовали как интактных, так и овариэктомированных животных. На 5-е сутки от сингенного переноса и иммунизации в селезенках мышей-реципиентов определяли количество АОК методом локального гемолиза в геле агарозы [8]. Контролем служили иммунизированные ЭБ мыши, либо не получавшие внутривенной инъекции спленоцитов-супрессоров, либо получавшие интактные сингенные клетки селезенки.

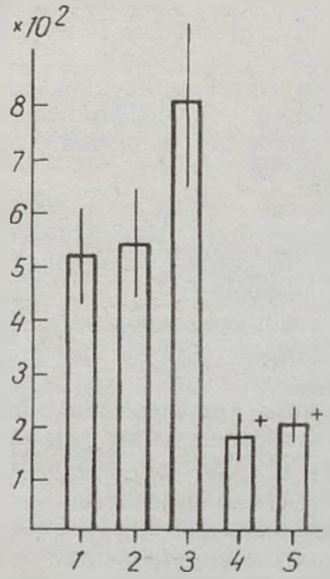
XI (Profasi, Serano, Италия) использовали в дозах 40 или 200 МЕ/мышь, что соответствует концентрации этого гормона во II-III и I триместрах беременности [2, 10]. При постановке эксперимента in vitro концентрация ХГ составляла 10 или 50 МЕ/мл при общем объеме одной макрокультуры 4 мл, т.е. соответствовала дозам, используемым in vivo. Контрольным животным инъецировали растворитель ХГ — изотонический NaCl, который также использовался in vitro в контрольных культурах спленоцитов-супрессоров.

Эксперимент ставили в следующих вариантах: 1) подкожное введение ХГ некастрированным и овариэктомированным реципиентам на 2-е и 4-е сутки от момента переноса спленоцитов-супрессоров; 2) предварительная часовая инкубация клеток-супрессоров с ХГ при 38°С в условиях макрокультуры (среда 199, концентрация клеток $5 \cdot 10^6$ в 1 мл) и перенос этих клеток некастрированным мышам-самкам с последующей оценкой количества АОК в селезенках реципиентов.

Параллельно с экспериментальными сериями определяли принадлежность селезеночных клеток-супрессоров к Т-лимфоцитам и антигенную специфичность их функциональной активности. Для этого спленоциты-супрессоры, индуцированные супраоптимальной дозой ЭК, переносили реципиентам, иммунизированным ЭБ, а также фракционировали клетки селезенки доноров на колонке с найлоновой ватой [9]. Все результаты обрабатывали с помощью критерия Стьюдента, оперируя $\log_{10}$ (lg) натуральных чисел.

Результаты и их обсуждение

Индукция клеток-супрессоров высокой дозой тимусзависимого антигена (ЭБ) кумулирует в селезенках мышей-доноров функционально активные клетки, которые в системе сингенного переноса достоверно супрессируют антителообразование, снижая выход АОК в 4 раза от оптимального уровня первичного иммунного ответа (см.



Характеристика функциональной активности спленоцитов-супрессоров в тесте угнетения АОК у сингенных реципиентов.

По вертикали — число АОК на 10^6 ЯСК селезенки реципиентов; по горизонтали: *1* — первичный иммунный ответ; *2* — перенос интактных спленоцитов ($5 \cdot 10^7$) иммунизированным реципиентам; *3* — перенос спленоцитов-супрессоров ($5 \cdot 10^7$), индуцированных ЭК; *4* — перенос спленоцитов-супрессоров ($5 \cdot 10^7$), индуцированных ЭБ; *5* — перенос Т-лимфоцитов-супрессоров ($5 \cdot 10^7$), индуцированных ЭБ. +- $p < 0,001$ относительно 1, 2, 3-й группы.

Таблица 1

Влияние ХГ на способность антигеноспецифичных клеток-супрессоров угнетать процессы формирования АОК у некастрированных мышей-самок ($M \pm m$)

Экспериментальное воздействие	Число мышей	ЯСК селезенки ($\cdot 10^6$)	lg АОК/10^6 ЯСК	lg АОК на селезенку
1. Контроль (перенос супрессоров)	18	197,3 ± 18,5	2,139 ± 0,101 (203,4)	4,404 ± 0,084 (32 658,3)
2. Введение ХГ (40 МЕ/мышь)	9	139,7 ± 11,8	2,325 ± 0,096 (242,5)	4,459 ± 0,081 (32 404,3)
p_{2-1}		<0,02	>0,05	>0,05
3. Введение ХГ (200 МЕ/мышь)	6	219,5 ± 36,4	2,208 ± 0,077 (174,8)	4,523 ± 0,065 (35 265,0)
p_{3-1}		>0,05	>0,05	>0,05
p_{3-2}		>0,05	>0,05	>0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: в скобках — натуральное число АОК.

Таблица 2

Влияние ХГ на способность антигеноспецифичных клеток-супрессоров угнетать процессы формирования АОК у овариэктомированных мышей-самок ($M \pm m$)

Экспериментальное воздействие	Число мышей	ЯСК селезенки ($\cdot 10^6$)	lg АОК/10^6 ЯСК	lg АОК на селезенку
1. Контроль (перенос супрессоров овариэктомированным мышам)	29	199,6 ± 9,8	2,222 ± 0,051 (203,0)	4,507 ± 0,042 (37 027,2)
2. Овариэктомия, введение ХГ (40 МЕ/мышь)	10	149,0 ± 10,8	2,284 ± 0,065 (212,3)	4,446 ± 0,042 (29 107,7)
p_{2-1}		<0,002	>0,05	>0,05
3. Овариэктомия, введение ХГ (200 МЕ/мышь)	10	139,7 ± 15,7	2,541 ± 0,086 (417,7)	4,660 ± 0,064 (50 201,2)
p_{3-1}		<0,002	<0,002	<0,05
p_{3-2}		>0,05	<0,05	<0,02

рисунок). Клетки-супрессоры обладают выраженной антигенной специфичностью, поскольку генерированные другим корпускулярным антигеном (ЭК) не влияют на уровень АОК индуцированных ЭБ. Фракционирование клеток селезенки на колонке с найлоновой ватой, способной пропускать только Т-лимфоциты [9] и антигеноспецифичные Т-лимфоциты-супрессоры [1], демонстрирует принадлежность спленоцитов-супрессоров к Т-лимфоцитам (см. рисунок), что подтверждает заключение авторов используемой модели [12].

Таким образом, обсуждаемые ниже эффекты ХГ корректно интерпретировать как результат избирательного влияния гормона на данную субпопуляцию Т-лимфоцитов.

Реализация функциональной активности Т-лимфоцитов-супрессоров не зависит от того, к какому реципиенту, овариэктомированному или некастрированному, переносятся данные клетки (табл. 1, 2), т.е. гормональный фон кастрированных животных не оказывает значимого влияния на функцию клеток супрессоров.

Введение высокой (200 МЕ) и низкой (40 МЕ) доз ХГ некастрированным мышам-реципиентам клеток-супрессоров не оказывает существенного влияния на способность этих клеток угнетать формирование АОК. Можно лишь отметить статистически значимое снижение клеточности селезенки на фоне инъекций низкой дозы ХГ (см. табл. 1). У овариэктомированных животных гормон в дозе 200 МЕ достоверно угнетает активность Т-лимфоцитов-супрессоров, что проявляется в статистически достоверном увеличении количества АОК. Одновременно с этим инъекции низкой и высокой доз ХГ вызывают выраженное снижение количества ЯСК в селезенке реципиентов (см. табл. 2). Таким образом, мы вновь констатируем диссоциацию иммуномодулирующих эффектов ХГ в организме некастрированных и овариэктомированных животных. Этот феномен можно объяснить либо тем, что половые стероиды яичников, синтез которых активирует ХГ [5], нивелируют иммуномодулирующие эффекты гонадотропина, либо тем, что яичники в силу тропизма ХГ выступают в качестве специфического сорбента гормона, что выводит его из циркуляции в кровеносном русле. Подобные результаты ранее нами уже описаны [3, 4]. Для подтверждения возможности непосредственного гормонального действия на спленоциты-супрессоры была проведена серия экспериментов с элементом предварительной обработки ХГ клеток-супрессоров in vitro. Результаты, полученные в данной серии, подтверждают способность ХГ вне зависимости от концентрации непосредственно угнетать функциональную активность Т-лимфоцитов-супрессоров. Важно отметить, что при такой постановке эксперимента клеточность селезенки реципиента не изменяется (табл. 3). Следовательно, ХГ, воздействуя непосредственно на спленоциты, не нарушает хоминг Т- лимфоцитов-супрессоров, несмотря на то, что in vivo гормон достоверно снижает клеточность селезенки. По-видимому, в целостном организме ХГ, помимо непосредственного угнетения активности антигеноспецифичных супрессоров, инициирует эмиграцию этих клеток за пределы селезенки.

Таблица 3

Влияние ХГ на функциональную активность антигеноспецифичных клеток-супрессоров в условиях in vitro ($M \pm m$)

Экспериментальное воздействие	Число мышей	ЯСК селезенки ($\cdot 10^6$)	lg АОК/10^6 ЯСК	lg АОК на селезенку
1. Контроль (перенос супрессоров)	38	268,3 ± 11,0	1,771 ± 0,019 (61,1)	4,187 ± 0,019 (15 949,0)
2. Введение ХГ (10 МЕ/мл)	23	230,0 ± 13,4	1,936 ± 0,036 (93,4)	4,283 ± 0,032 (20 341,0)
p_{2-1}		>0,05	<0,001	<0,02
3. Введение ХГ (50 МЕ/мл)	12	253,7 ± 12,4	1,935 ± 0,038 (89,8)	4,334 ± 0,031 (22 193,8)
p_{3-2}		>0,05	>0,05	>0,05
p_{3-1}		>0,05	<0,001	<0,001

Можно предполагать, что это действие гормона реализуется на уровне клеток стромы и приводит к снижению количества ЯСК в органе реципиентов при одновременном росте удельного количества АОК, определяемого при расчете показателя на 10^6 клеток (см. табл. 2). Такое сочетание наблюдается только при инъекции высокой дозы ХГ овариэктомированным животным. Наличие полноценно функционирующих яичников препятствует данному эффекту гормона.

Представленные результаты согласуются с концепцией плацентарной иммунотрофики Вегмана [11]. Так, ХГ, непосредственно угнетая функциональную активность антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров, с одной стороны, открывает путь к повышению синтеза блокирующих антител, с другой — предотвращает супрессию секреции лимфоцитами и макрофагами плаценты цитокинов, дающих мощные ростстимулирующие эффекты в отношении всего фетоплацентарного комплекса [7].

Выводы

1. Введение ХГ в дозах, характерных для различных триместров беременности, некастрированным самкам не оказывает действия на способность антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров реализовать иммунодепрессивные потенции.

2. Овариэктомия способствует проявлению иммуномодулирующего действия высокой дозы ХГ (200 МЕ/мышь), заключающегося в угнетении функции антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров.

3. Непосредственный контакт ХГ (10 или 50 МЕ/мл) с антигеноспецифичными Т-лимфоцитами-супрессорами угнетает их функциональную активность по отношению к процессам формирования АОК.

4. ХГ у кастрированных и некастрированных самок угнетает количество ЯСК селезенки, однако данный феномен может быть связан с эмиграцией антигеноспецифичных Т-лимфоцитов-супрессоров только в случае воздействия высокой дозы гормона на фоне овариэктомии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Брондз Б. Д.* Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. — М., 1987.
2. *Димитров Д. Я.* Хориальный гонадотропин человека. — М., 1979.
3. *Кеворков Н. П., Ширшев С. В., Князев Ю. А.* // Пробл. эндокринол. — 1988. — Т. 34, № 6. — С. 79-83.
4. *Кеворков Н. П., Шилов Ю. И., Ширшев С. В., Черешнев В. А.* Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета. — Екатеринбург, 1993.
5. *Савченко О. Н.* Гормоны яичника и гонадотропные гормоны. — Л., 1967.
6. *Ширшев С. В., Кеворков Н. П.* // Успехи соврем. биол. — 1991. — Т. 111, № 5. — С. 683-697.
7. *Ширшев С. В.* // Там же. — 1994. — Т. 114, № 2. — С. 223-240.
8. *Jerne N. K., Nordin A. A.* // Science. — 1963. — Vol. 140, N 3365. — P. 405-405.
9. *Julius E. L., Simpson J., Herzenberg L.* // Europ. J. Immunol. — 1973. — Vol. 3. — P. 646-648.
10. *Kase N. G., Reyniak J. V.* // Mount Sinai J. Med. — 1985. — Vol. 52, N 1. — P. 11-34.
11. *Wegmann T. G.* // Amer. J. reprod. Immunol. Microbiol. — 1987. — Vol. 15, N 2. — P. 67-70.
12. *Whisler R. L., Stobo J. D.* // J. exp. Med. —1976. — Vol. 144, N 2. — P. 398-413.

Поступила 22.06.94

S. V. Shirshev — EFFECT OF CHORIONIC GONADOTROPIN ON THE REGULATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTIGEN-SPECIFIC T-SUPPRESSORS

Summary. Effects of chorionic gonadotropin (CG) on the functional activity of antigen-specific T-suppressors generated in CBA mice on day 14 by supraoptimal dose of thymus-dependent antigen were studied. The activity of T-suppressors was assessed by the level of antibody-producing (ABP) cells forming in the organism of suppressor cell recipients immunized with the same antigen. CG was injected to intact and oophorectomized recipient mice or was directly incubated in a one-hour cell culture with antigenspecific suppressor cells which were then transplanted to intact female mice. CG in a dose of 40 or 200 IU did not influence the capacity of T-suppressors to suppress primary immune response in intact females. In oophorectomized animals the hormone statistically reliably decreased the activity of T-suppressors, no matter what its dose were, and depressed the splenocyte activity. In a cell culture CG similarly depressed T-suppressor functional activity without influencing their homing.