© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 616.432-006-076.5

А. А. Булатов, Е. Е. Макаровская, Н. Б. Смирнова, В. Г. Шлыкова, С. Ю. Касумова

МУЛЬТИГОРМОНАЛЬНАЯ СЕКРЕТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КЛИНИЧЕСКИ НЕ ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ ГИПОФИЗА IN VITRO И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ТИРОЛИБЕРИНА

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, НИИ нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко (дир. — акад. РАМН А. Н. Коновалов) РАМН, Москва

В опытах на клеточных культурах показано, что изолированные клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза способны освобождать в среду в небольшом количестве несколько гормонов, в том числе лютеинизирующий, фолликулостимулирующий гормоны, α-субъединицу гликопротеиновых гормонов, а также пролактин и гормон роста. Мультигормональный характер секреторной активности этих клеток свидетельствует об их слабой морфофункциональной дифференцировке. Клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза в отличие от нормальных гипофизарных клеток отвечают на гипоталамический гормон тиролиберин неспецифически — усилением секреции не только пролактина, но и гонадотропинов, α-субъединицы гликопротеиновых гормонов и гормона роста. Это свойство опухолевых клеток, выявленное в условиях in vitro, согласуется с возможностью повышения уровня гонадотропинов и α-субъединицы гликопротеиновых гормонов в сыворотке крови больных с клинически не функционирующей опухолью гипофиза в ходе фармакодинамической пробы с тиролиберином.

Experiments on cell cultures demonstrated that isolated cells of clinically inert pituitary tumors release several hormones in small amounts into the medium: luteinizing and follicle-stimulating hormones, alpha-subunit of glycoprotein hormones, prolactin, and growth hormone. Multihormonal secretion of these cells indicates their poor morphofunctional differentiation. In contrast to normal pituitary cells, cells of clinically inert pituitary tumors respond nonspecifically to hypothalamic thyrotropin releasing hormone: by increased secretion of prolactin, gonadotropins, glycoprotein hormone alpha-subunit, and growth hormone. This capacity of tumor cells detected ***in vitro*** *agrees with the probability of increased levels of gonadotropins and glycoprotein hormone alpha-subunit in the serum of patients with clinically inert pituitary tumors during pharmacodynamic thyrotropin releasing hormone test.*

Опухоли гипофиза, как правило, представляют собой аденомы, активно продуцирующие и секретирующие гормоны; проявляются высоким уровнем того или иного гормона в циркулирующей крови и характерным клиническим синдромом его гиперсекреции. Однако 25—30% опухолей гипофиза относятся к так называемым клинически не функционирующим или гормонально-неактивным опухолям [9, 10]. Они не сопровождаются существенным возрастанием содержания гипофизарных гормонов в крови и потому их клеточная биология, патогенетические механизмы, ранняя диагностика и клинический мониторинг составляют особую проблему. Одним из важных направлений исследований является поиск маркеров этих опухолей. В качестве возможных биохимических маркеров гипофизарных опухолей, в том числе клинически не функционирующих, рассматриваются свободные субъединицы гликопротеиновых гормонов, которые могут секретироваться опухолевыми клетками гипофиза [2, 3, 8, 9].

Поскольку эффективным методологическим приемом в изучении клеточно-биологических особенностей различных типов опухолей гипофиза может быть клеточное культивирование [1, 4, 6], в настоящей работе в опытах на культурах изолированных клеток клинически не функционирующих опухолей гипофиза исследованы их базальная секреторная активность по целому спектру возможных продуктов секреции и влияние на нее гипоталамического пептидного гормона тиролиберина. Как известно, специфическая функция тиролиберина состоит в избирательной стимуляции секреции двух гормонов гипофиза — тиреотропного гормона (ТТГ) и пролактина (Прл) соответственно тиреотрофами и лактотрофами. Нормальные высокодифференцированные клетки гипофиза, секретирующие иные гормоны (гонадотрофы, соматотрофы, кортикотрофы), лишены рецепторов тиролиберина и не способны на него реагировать изменением своей функциональной активности. Между тем в литературе имеются сведения о том, что у больных с клинически не функционирующими опухолями гипофиза тиролиберин может повышать уровень гонадотропинов и/или их свободных субъединиц в сыворотке крови [9]. Последнее может указывать на наличие у клеток этих опухолей рецепторов тиролиберина, отсутствующих на мембранах нормальных гонадотрофов.

Материалы и методы

Ткань клинически не функционирующих опухолей гипофиза была получена из операционного материала (НИИ нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко РАМН) от 4 больных, у которых до операции содержание гипофизарных гормонов в сыворотке крови было в пределах нормы и не отмечалось клинических признаков их гиперсекреции. Показанием к операции служили неврологи-

ческие симптомы сдавления опухолью окружающих тканей мозга.

Кусочек опухолевой ткани содержали до начала исследования в среде 199 ("Flow", Англия) при 4°С не более 1 сут. Ткань после отмывания от крови растворами Версена и ЭДТА и удаления сосудов разрезали на мелкие фрагменты толщиной около 1 мм и подвергали дезагрегации на отдельные клетки воздействием 0,25% раствора трипсина ("Sigma", США) в течение 30 мин при 37°С. Более подробно техника получения изолированных клеток из ткани опухолей гипофиза описана ранее [1, 6].

После центрифугирования при 800 g клетки ресуспендировали в среде инкубации, состоящей из среды 199 с добавлением 10% сыворотки крови эмбрионов коров ("Calbiochem", США) и пенициллина (50 ЕД/мл). Клеточную суспензию высевали в 24-луночные пластиковые макропанели ("Flow, Англия) по 600 тыс. клеток в лунку в 1 мл среды. Клетки инкубировали в термостате при 37°С в атмосфере воздуха с 5% CO_2. Через 24 ч инкубации, когда клетки прикреплялись к поверхности пластика, инкубационную среду меняли на новую порцию. Клетки инкубировали в свежей среде в течение 48 ч. После инкубации клеток среду отбирали, замораживали и хранили при −30°С до проведения анализа в ней содержания гормонов. В объединенной среде из 3 лунок определяли содержание лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, ТТГ, Прл, гормона роста (ГР), а также свободной α-субъединицы (АС) гликопротеиновых гормонов.

При исследовании влияния тиролиберина на секреторную активность опухолевых клеток в лунки макропанели после предыдущей 48-часовой инкубации добавляли свежую порцию питательной среды с синтетическим препаратом тиролиберина (Институт органического синтеза, Латвия) в концентрации 10 нг/мл или без него (контроль) и клетки продолжали инкубировать в течение 1 или 24 ч. По завершении инкубации в среде определяли содержание гормонов.

Для изучения действия тиролиберина на уровень гонадотропинов и АС в сыворотке крови у больных с клинически не функционирующей опухолью гипофиза вводили внутривенно по 200 мг этого гипоталамического гормона (препарат "TRH-Ferring", Германия). Содержание гормонов в сыворотке крови исследовали до и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после введения препарата.

Определение содержания гормонов и свободной АС в среде инкубации изолированных опухолевых клеток или в сыворотке крови осуществляли радиоиммунологическим методом с использованием тест-систем, разработанных в Институте экспериментальной эндокринологии ЭНЦ РАМН на основе высокоочищенных антигенов и моноспецифических поликлональных антисывороток. В качестве рабочих стандартов при этом применяли препараты гормонов высокой степени очистки, аттестованные по международным стандартам ВОЗ. Чувствительность радиоиммунологической тест-системы для ЛГ составляла 0,05 нг/мл (0,8 мЕД/мл), для ФСГ — 0,24 нг/мл (0,85 мЕД/мл), для ТТГ — 0,05 нг/мл (0,5 мкЕД/мл), для Прл — 0,5 нг/мл (20 мкЕД/мл), для ГР — 0,1 нг/мл, для АС — 0,15 нг/мл. Коэффициент вариации результатов определения в тест-системах не превышал 8%.

Результаты и их обсуждение

Культивируемые in vitro клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза, как можно видеть из табл. 1, проявляли определенный секреторный потенциал, освобождая в среду измеряемое радиоиммунологическим методом количество гормонов. Иначе говоря, эти опухолевые клетки не утратили внутриклеточные структуры и механизмы, осуществляющие биосинтез и секрецию гормонов.

Важной особенностью секреторной активности клеток исследуемых опухолей является ее мультигормональный характер, что отличает их от нормальных высокодифференцированных клеток гипофиза или клеток так называемых гормонально-активных опухолей, способных к продукции и секреции преимущественно одного из гипофизарных гормонов. Все клеточные культуры секретировали несколько гормонов, в том числе оба гонадотропина или ЛГ (опухоль № 1), свободную АС гликопротеиновых гормонов, Прл, а культуры клеток двух опухолей (№ 1 и № 3) дополнительно секретировали ГР. Ни в одной клеточной культуре в среде не обнаружено ТТГ.

Следует отметить, что в наших опытах с клеточным культивированием после 48 ч инкубации довольно значительного числа клеток в небольшом объеме среды (600 тыс. клеток в 1 мл) содержание гормонов в среде было невелико. Оно вполне сопоставимо с нормальным содержанием гормонов гипофиза в сыворотке крови и во много раз ниже содержания гормонов, обнаруживаемого в среде при культивировании примерно в тех же условиях клеток гормонально-активных опухолей гипофиза [1, 3, 4, 6]. Это означает, что уровень секреторной активности клеток исследуемых нами опухолей был явно недостаточным для существенного пополнения пула гипофизарных гормонов, циркулирующих в крови. Исключением была свободная АС. Ее содержание в среде инкубации всех опухолей заметно превышало нормальное содержание АС в сыворотке крови, составляющее, по нашим данным [2], в среднем 0,90 ± 22 ($M \pm \sigma$).

По современным представлениям, основанным на молекулярно-биологических исследовани-

Таблица 1

Содержание гормонов (в нг/мл) в среде культивирования клеток клинически не функционирующих опухолей гипофиза через 48 ч инкубации

Номер опухоли	ЛГ	ФСГ	ТТГ	АС	ГР	Прл
1	1,17	0	0	6,65	8,79	32,50
2	0,94	0,54	0	3,65	0	1,84
3	1,15	0,70	0	2,65	0,95	1,18
4	0,80	0,65	0	2,98	0	0,85

Примечание. Условия культивирования см. в разделе "Материалы и методы". Здесь и в табл. 2: 0 — содержание гормона в среде ниже чувствительности используемой радиоиммунологической тест-системы: в случае ТТГ — ниже 0,05 нг/мл, в случае ГР — ниже 0,1 нг/мл.

Таблица 2

Влияние тиролиберина на секреторную активность культур клеток клинически не функционирующих опухолей гипофиза

Номер опухоли	Условия опыта	Содержание гормонов в среде, нг/мл ($M \pm m$; $n = 4$)				
		ЛГ	ФСГ	АС	ГР	Прл
1	Инкубация 1 ч без тиролиберина (контроль)	0,20 ± 0,05	0	0,54 ± 0,01	0,28 ± 0,20	10,00 ± 1,10
	Инкубация 1 ч с тиролиберином (10 нг/мл)	0,92 ± 0,01	0	4,84 ± 0,40	2,53 ± 0,09	54,80 ± 7,70
	p	< 0,001		< 0,001	< 0,001	< 0,01
2	Инкубация 24 ч без тиролиберина (контроль)	0,68 ± 0,07	1,01 ± 0,06	2,02 ± 0,11	0	1,65 ± 0,19
	Инкубация 24 ч с тиролиберином (10 нг/мл)	1,80 ± 0,09	5,66 ± 1,08	9,32 ± 1,95	0	2,57 ± 1,54
	p	< 0,001	< 0,01	< 0,01		> 0,05

ях, опухоли гипофиза, в том числе клинически не функционирующие, имеют моноклональную природу [7, 9, 11], т. е. опухоль гипофиза является результатом экспансии одного клона генетически трансформированных клеток, что предполагает однородность ее клеточной популяции. Исходя из этого, мультигормональный характер базальной секреторной активности изученных нами клинически не функционирующих опухолей гипофиза может свидетельствовать об их слабой морфофункциональной дифференцировке. Вполне возможно, что процесс опухолевой трансформации клетки сопровождается большей или меньшей клеточной дедифференцировкой и активацией в клетке экспрессии целого ряда генов гормонов и клеточных рецепторов, не свойственной нормальным специализированным клеткам гипофиза. Таким образом, в основе формирования клинически не функционирующей опухоли гипофиза может лежать пролиферация клона малодифференцированных трансформированных клеток. Невысокий уровень гормональной секреции, обнаруживаемый в культурах клеток опухолей такого типа, указывает на их функциональную неполноценность. Нарушение нормальных внутрисекреторных механизмов процессинга продуктов генной экспрессии, проявляющееся в секреции клетками наряду со зрелыми гонадотропинами значительного количества свободной АС гликопротеиновых гормонов, подтверждает функциональную неполноценность клеток клинически не функционирующих опухолей гипофиза.

Слабая дифференцировка клеток исследуемых опухолей проявляется не только множественностью секретируемых ими в клеточной культуре гормонов, но и неспецифическим характером реакции со стороны их секреции на тиролиберин. В табл. 2 представлены результаты изучения влияния этого гипоталамического стимулятора на секреторную активность культур клеток опухолей № 1 и 2. Можно видеть, что клетки обеих культур оказались достаточно высокочувствительными к тиролиберину, что свидетельствует об активной экспрессии в клетках гена его рецептора. Тиролиберин, присутствовавший в среде инкубации в концентрации 10 нг/мл, существенно увеличивал освобождение в среду всего изученного спектра секретируемых клеточными культурами продуктов. В культуре клеток опухоли № 1 (инкубация в течение 1 ч) содержание ЛГ возрастало в 4,6 раза, Прл — в 5,5 раза, АС и ГР — в 9 раз. В культуре клеток опухоли № 2 (инкубация в течение 24 ч) содержание ЛГ возрастало в 2,6 раза, АС — в 4,6 раза, ФСГ — в 5,6 раза, увеличение содержания Прл (в 1,6 раза) было статистически недостоверным.

Выявленная в опытах in vitro способность тиролиберина вызывать освобождение из клеток клинически не функционирующих опухолей гипофиза гонадотропинов и АС гликопротеиновых гормонов соответствует клиническим данным. Как указывают H. Katznelson и соавт. [9], до 40% больных с клинически не функционирующими опухолями гипофиза отвечают на введение тиролиберина увеличением содержания в сыворотке

Таблица 3

Содержание ЛГ, ФСГ, АС и Прл в сыворотке крови у больных с клинически не функционирующей опухолью гипофиза до и через 15—120 мин после внутривенного введения 200 мг тиролиберина

Больная	Время, мин	ФСГ		ЛГ		АС	Прл	
		мЕд/мл	нг/мл	мЕд/мл	нг/мл	нг/мл	мкЕд/мл	нг/мл
Г.	0	3,65	1,04	2,87	0,19	1,65	401,80	10,05
	15	3,50	1,00	7,31	0,49	1,36	1322,20	33,06
	30	4,82	1,38			1,17	1122,50	28,06
	60	2,46	0,70	5,94	0,40	1,48	707,20	17,68
	90	2,75	0,80	6,23	0,42	1,46	630,30	15,76
	120	2,86	0,82	5,98	0,40		363,90	9,10
Н.	0	2,13	0,61	3,44	0,23	0,68	268,10	6,70
	15	2,14	0,61	4,30	0,29	1,33	867,80	21,70
	30	2,69	0,77	6,30	0,42	1,53	698,20	17,46
	60	2,85	0,80	6,09	0,41	0,97	439,10	10,98
	90	1,54	0,44	3,49	0,23	0,74	334,30	8,36
	120	2,64	0,75	2,78	0,19	0,66	145,40	3,64
Р.	0	3,47	0,99	5,88	0,39	0,87	277,67	6,94
	15	3,50	1,00	3,39	0,23	1,65	1618,96	40,47
	30	5,06	1,45	4,65	0,31	2,05	1350,3	33,76
	60	2,45	0,70	4,18	0,28	1,27	730,5	18,26
	90	2,66	0,76	6,22	0,41	0,88	466,86	11,67
	120	3,18	0,91	5,00	0,33	1,39	350,18	8,75
С.	0	6,17	1,76	9,77	0,65	2,00	219,80	5,50
	15	7,50	2,14	7,74	0,52	2,05	1428,90	35,72
	30	6,20	1,77	7,27	0,49	2,24	1316,40	32,91
	60	5,85	1,67	7,90	0,53	1,47	484,10	12,10
	90	7,96	2,27	10,79	0,72	1,78	417,90	10,37
	120	6,44	1,84	8,23	0,55	1,75	307,00	7,68

крови гонадотропинов и/или их свободных субъединиц. Нами были исследованы изменения содержания Прл, ЛГ, ФСГ и АС в сыворотке крови в ходе фармакодинамической пробы с внутривенным введением тиролиберина у 4 женщин репродуктивного возраста с клинически не функционирующей эндоселлярной опухолью гипофиза и синдромом поликистозных яичников. Согласно клиническим наблюдениям [5], у женщин сочетание опухоли такого типа с синдромом поликистозных яичников встречается довольно часто и может свидетельствовать о существовании определенной патогенетической связи между ними. Опухоль гипофиза у обследованных больных была выявлена в результате компьютерной или магнитно-резонансной томографии области турецкого седла. Результаты наших исследований подтвердили, что у больных с клинически не функционирующими опухолями гипофиза тиролиберин может стимулировать секрецию не только Прл, но и ЛГ, ФСГ или АС. Из табл. 3 видно, что у больной Г. тиролиберин через 15—30 мин после введения вызывал повышение уровня Прл в 3,3 раза, ЛГ в 2,6 раза, ФСГ в 1,3 раза. У больной Н. уровень Прл повышался в 3,2 раза, АС — в 2,25 раза, ЛГ — в 1,8 раза. У больной Р. отмечено повышение уровня АС в сыворотке крови в 2,4 раза и ФСГ в 1,5 раза. Только у больной С. в ответ на введение тиролиберина содержание ЛГ, ФСГ и АС в сыворотке крови не изменялось при повышении содержания Прл в 6,5 раза.

Таким образом, исследование реакции ЛГ, ФСГ и свободной АС сыворотки крови в ходе фармакодинамической пробы с тиролиберином может быть одним из подходов к более раннему выявлению клинически не функционирующих опухолей гипофиза. Причина неспецифического ответа на тиролиберин может состоять в том, что клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза, в большинстве случаев способные к продукции и секреции гонадотропинов и их субъединиц, в отличие от нормальных гонадотрофов, несут рецепторы тиролиберина.

Выводы

1. Изолированные клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза в клеточной культуре способны освобождать в среду в небольшом количестве несколько гормонов, в том числе ЛГ, ФСГ, АС гликопротеиновых гормонов, а также Прл и ГР. Мультигормональный характер секреторной активности этих клеток свидетельствует об их слабой морфофункциональной дифференцировке.

2. Трансформированные клетки клинически не функционирующих опухолей гипофиза в отличие от нормальных гипофизарных клеток отвечают на гипоталамический гормон тиролиберин неспецифически — усилением секреции не только Прл, но и гонадотропинов, АС гликопротеиновых гормонов и ГР.

3. Выявленное в условиях in vitro свойство опухолевых клеток существенно усиливать под влиянием тиролиберина секрецию гонадотропинов и АС гликопротеиновых гормонов согласуется с возможностью повышения их уровня в крови больных с клинически не функционирующей опухолью гипофиза в ответ на введение им этого гипоталамического гормона. Реакция в ходе фармакодинамической пробы с тиролиберином со стороны гонадотропинов и/или свободной АС гликопротеиновых гормонов сыворотки крови может быть одним из подтверждающих диагностических признаков такого рода опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Булатов А. А., Комолов И. С., Смирнова Н. Б.* и др. // Бюл. экспер. биол. — 1992. — № 4. — С. 406—409.
2. *Булатов А. А., Киселева А. Г., Горшкова Т. В., Акопова Н. Б.* // Пробл. эндокринол. — 1994. — № 6. — С. 44—47.
3. *Булатов А. А., Киселева А. Г., Горшкова Т. В.* и др. // Вопр. мед. химии. — 1995. — № 5. — С. 19—23.
4. *Булатов А. А., Мартынов А. В., Григорьян А. П., Комолов И. С.* // Биохимия. — 1995. — № 10. — С. 1637—1646.
5. *Вакс В. В., Марова Е. И., Гончаров Н. П.* и др. // Пробл. эндокринол. — 1997. — № 4. — С. 13—18.
6. *Комолов И. С., Булатов А. А., Макаровская Е. Е.* и др. // Бюл. экспер. биол. — 1994. — № 11. — С. 543—546.
7. *Alexander J. M., Biller B. M., Bikkal H.* et al. // J. clin. Invest. — 1990. — Vol. 86. — P. 336—340.
8. *Faglia G.* // Eur. J. Endocrinol. — 1995. — Vol. 133. — P. 23—24.
9. *Katznelson H., Alexander J. M., Klibanski A.* // J. clin. Endocrinol. Metab. — 1993. — Vol. 76. — P. 1089—1095.
10. *Luizzi A., Tassi V., Pierro M. T.* et al. // Metabolism. — 1996. — Vol. 45, N 8. — Suppl. 1. — P. 80—82.
11. *Spada A., Vallar L., Faglia G.* // Eur. J. Endocrinol. — 1994. — Vol. 130. — P. 43—52.

Поступила 28.05.98