

© С. В. ШИРШЕВ, 1993

УДК 616.357:577.175.63].015.46.07

С. В. Ширшев

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ВТОРИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Кафедра биохимии Пермского медицинского института

Хорионический гонадотропин (ХГ), синтезируемый плацентой человека, контролирует гормональные механизмы роста и развития фето-плацентраного комплекса с момента имплантации яйцеклетки до самых родов [1]. Полуаллогенный плод и плацента распознаются лимфоцитами матери как чужеродный антигенный материал, но в силу ряда причин не отторгаются ими [4]. Важную роль в этом играют гормоны беременности, оказывающие мощное иммунодепрессивное действие [5].

ХГ — наиболее активный модулятор иммунных реакций. Показано, что гормон дозозависимо угнетает реакции клеточного [7, 11] и гуморального [2, 9] звеньев иммунного ответа. Однако эти сведения, как правило, относятся лишь к влиянию ХГ на первичный ответ иммунокомпетентных клеток. Взаимоотношение иммунной системы матери с фето-плацентарным комплексом включает в себя не только первичный, но и вторичный, т. е. анамнестический, иммунный ответ, который приобретает доминирующее значение при повторных беременностях. Именно реакции вторичного типа приводят к таким грозным заболеваниям, как гемолитическая болезнь новорожденных, невынашивание и прочие иммунопатологические состояния, осложняющие течение беременности [3].

Целью настоящей работы было исследование иммуномодулирующих эффектов ХГ и половых стероидов яичников как его возможных посредников на процессы формирования анамнестического иммунного ответа.

Материалы и методы

Исследования проводились на мышах-самках линии СВА массой 18—22 г, полученных из питомника лаборатории животных РАМН «Рапполово». У части животных производилась операция двусторонней овариэктомии под эфирным наркозом. Такие мыши использовались в эксперименте после 1 мес реабилитации.

Схема индукции вторичного иммунного ответа включала в себя два этапа: 1-й этап — животных интраперитонеально иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ) в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток, 2-й этап — через 20 сут мышей вновь подвергали интраперитонеальной иммунизации такой же дозой ЭБ. Уровень вторичного иммунного ответа оценивался на 5-е сутки после реиммунизации методом локального гемолиза в геле агарозы по Эрне [8]. Определение антителообразующих клеток (АОК), продуцирующих IgG, проводили непрямым методом Эрне в модификации [6]. Для этого использовали предварительно оттитрованную антисыворотку кролика против IgG мыши («Диагностикум») в разведении 1:200.

ХГ («Profasi», Serapo, Италия) инъецировался подкожно на следующий день после повторной иммунизации и через 1 день, т. е. на 1-е и 3-и сутки формирования анамнестического ответа. Гормон использовали в двух дозах,

экстраполированных со средних концентраций ХГ в сыворотке крови беременных женщин в I и II—III триместрах, которые составили соответственно 200 и 40 МЕ [12]. Для исключения опосредованности иммуномодулирующих эффектов ХГ через половые стероиды яичников использовали не только овариэктомированных самок, но и непосредственное воздействие гормона *in vitro* на клетки селезенки. Для этого использовали некастрированных мышей-самок, у которых был индуцирован только первичный иммунный ответ. Таких доноров забивали на 20-е сутки от момента первичной иммунизации и асептично полученные клетки селезенки инкубировали в течение 1 ч в термостате (37 °С) в питательной среде 199 с ХГ (40 или 200 МЕ на культуру). Использовали вариант макрокультуры — $2 \cdot 10^7$ ядродержащих клеток (ЯСК) селезенки в 4 мл среды 199. Контролем служили спленоциты, инкубированные в питательной среде без гормона. После односторонней инкубации клетки отмывали средой 199 и концентрировали таким образом, чтобы в 0,5 мл среды содержалось $2 \cdot 10^7$ ЯСК. Затем эти клетки совместно с ЭБ ($2 \cdot 10^8$) переносили в хвостовую вену летально облученных (219,3 мКл/кг) сингенных мышей-реципиентов. Адаптивный вторичный иммунный ответ оценивали аналогично описанному выше. Жизнеспособность спленоцитов после культивирования, оцениваемая с помощью трипанового синего, составляла от 92 до 98 %.

Таким образом в экспериментах, проводимых в условиях культуры клеток, не только исключалась опосредованность иммуномодулирующего действия ХГ, но и оценивался эффект гормона на клетки, которые еще не получили второй антигенный сигнал.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью критерия *t* Стьюдента. Во всех расчетах оперировали \log_{10} (lg) числа АОК.

Результаты и их обсуждение

Введение ХГ некастрированным мышам-самкам не оказывает статистически значимого влияния на уровень М- и G-АОК. В то же время инъекции высокой дозы (200 МЕ) ХГ достоверно угнетают количество ЯСК в селезенке (табл. 1). Соотношение М- и G-антителопродуцентов практически не изменяется, оставаясь постоянным — 1/10.

Овариэктомия практически не влияет на уровень М- и G-АОК, определяющих вторичный иммунный ответ. Клеточность селезенки также не изменяется. Введение ХГ в дозе, соответствующей концентрации гормона во II—III триместре беременности (40 МЕ), не в состоянии оказать какого-либо действия на процессы формирования анамнестического иммунного ответа (см. табл. 1). Сопоставление результатов, полученных у некастрированных животных, с результатами у овариэктомированных мышей также не выявило статистически достоверной разницы. По-видимому, ХГ в данной дозе не опосредует свои иммуномодулирующие эффекты через половые стероиды, как при действии на процессы формирования первичного иммунного ответа [2].

Влияние ХГ на уровень вторичного иммунного ответа у некастрированных и овариэктомированных животных ($M \pm m$)

Группа животных	Экспериментальное воздействие	ЯСК · 10 ⁻⁶	IgM-АОК	IgG-АОК
		в селезенке		
1-я (контроль; n=11)	—	232,7 ± 15,8	3,703 ± 0,084 (6138,0)	4,683 ± 0,090 (58064,1)
2-я (n=12)	40 МЕ ХГ	192,9 ± 15,3	3,730 ± 0,100 (6926,5)	4,758 ± 0,071 (64376,0)
3-я (n=10)	200 МЕ ХГ	$p_{2-1} > 0,05$ 183,0 ± 11,1 $p_{3-1} < 0,02$ $p_{3-2} > 0,05$	$p_{2-1} > 0,05$ 3,591 ± 0,059 (4263,8) $p_{3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$	$p_{2-1} > 0,05$ 4,652 ± 0,095 (53472,0) $p_{3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
4-я (контроль; n=9)	Овариэктомия	224,3 ± 9,8 $p_{4-1} > 0,05$	3,675 ± 0,052 (5029,4) $p_{4-1} > 0,05$	4,802 ± 0,070 (69438,9) $p_{4-1} > 0,05$
5-я (n=11)	Овариэктомия + 40 МЕ ХГ	225,1 ± 16,0 $p_{5-4} > 0,05$	3,649 ± 0,063 (5029,8) $p_{5-4} > 0,05$ $p_{5-2} > 0,05$	4,822 ± 0,072 (76188,1) $p_{5-4} > 0,05$ $p_{5-2} > 0,05$
6-я (n=12)	Овариэктомия + 200 МЕ ХГ	156,0 ± 6,8 $p_{6-4} < 0,001$ $p_{6-5} < 0,001$ $p_{6-3} > 0,05$	3,536 ± 0,044 (3651,5) $p_{6-4} > 0,05$ $p_{6-5} > 0,05$ $p_{6-3} > 0,05$	4,601 ± 0,038 (41691,2) $p_{6-4} < 0,02$ $p_{6-5} < 0,02$ $p_{6-3} > 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 2 — в качестве контроля использовали животных, которым инъецировали растворитель гормона — стерильный физиологический раствор; n — количество животных в группе; в скобках — абсолютное число АОК.

В дозе, экстраполированной с максимальной концентрации гормона в период беременности (7—10 нед), ХГ, инъецируемый овариэктомированным животным, статистически достоверно угнетает не только клеточность селезенки, но и вторичный иммунный ответ. Следует отметить, что в данном случае угнетение АОК избирательно и связано лишь с G-антителопродукентами. M-АОК не подвергаются иммунодепрессивному воздействию высокой дозы ХГ (см. табл. 1). Статистически достоверная разница в количестве G-АОК, формирующихся под влиянием 40 и 200 МЕ ХГ, свидетельствует о дозозависимости иммуносупрессивного эффекта гормона. Разницы между овариэктомированными и некастрированными животными, как и в случае с дозой 40 МЕ, не выявлено.

Таким образом, можно констатировать иммунодепрессивный эффект высокой дозы ХГ, избирательно угнетающей процессы формирования G-АОК — основных антителопродукентов анамне-

стического иммунного ответа. Не исключено, что подобный эффект зависит от способности гормона в этой дозе снижать клеточность селезенки. Помимо этого, необходимо отметить неспособность половых стероидов, чей синтез индуцируется ХГ [1], влиять на процессы формирования вторичного иммунного ответа.

Внесение гормона в культуру клеток селезенки в дозе 40 МЕ не оказывает значимого влияния на уровень M-АОК или G-АОК, формирующихся у облученных реципиентов. В то же время в дозе 200 МЕ ХГ достоверно угнетает способность иммунных спленоцитов формировать при вторичном контакте с антигеном анамнестический иммунный ответ. Однако в отличие от экспериментальной модели *in vivo* ХГ угнетает M-антителопродукенты *in vitro* (табл. 2). Это, по всей видимости, связано только с уровнем активации предшественников АОК (ПАОК). Если, в первой серии экспериментов ХГ воздействовал на ПАОК после их повторного контакта с антигеном, то в экспериментах *in vitro* гормон контактировал с клетками памяти, которые были сенсibilизированы, но не активированы антигеном. Из этого можно заключить, что ХГ-зависимая иммунодепрессия ассоциирована не только с дозой гормона, но и с уровнем активации лимфоидных клеток. Антиген, по-видимому, способен селекционировать иммунокомпетентные клетки для регуляторного действия ХГ.

Таким образом, можно говорить о реальной иммуносупрессии вторичного ответа гормоном беременности как на этапе сенсibilизации, так и на этапе формирования антителопродукентов, но лишь в период его максимальной секреции — 7—10 нед. С позиции физиологии беременности данный эффект гормона и ограничение его

Таблица 2

Влияние ХГ *in vitro* на способность спленоцитов формировать адаптивный вторичный иммунный ответ ($M \pm m$)

Группа животных	Доза ХГ, МЕ	IgM-АОК ($2 \cdot 10^7$)	IgG-АОК ($2 \cdot 10^7$)
1-я (контроль; n=21)	—	3,057 ± 0,051 (1301,5)	3,078 ± 0,040 (1301,8)
2-я (n=12)	40	3,019 ± 0,104 (1399,8) $p_{2-1} > 0,05$	3,118 ± 0,072 (1513,8) $p_{2-1} > 0,05$
3-я (n=11)	200	2,814 ± 0,073 (737,6) $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} > 0,05$	2,917 ± 0,082 (960,3) $p_{3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$

по времени оправданны, так как именно в этот период на клетках плода экспрессируются антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA) [10]. Однако, если говорить о патологической беременности, как в случае с гемолитической болезнью новорожденных, то простое сопоставление сроков появления фетальных эритроцитов в кровотоке матери (15 нед беременности [3]) показывает, что процессы формирования вторичного иммунного ответа выходят за временные рамки действия высокой дозы ХГ. Можно предполагать, что такое несоответствие способствует при определенных условиях развитию иммунопатологического процесса.

Выводы

1. ХГ оказывает угнетающее действие на процессы формирования вторичного иммунного ответа в дозе, соответствующей его концентрации в 7—10 нед беременности (200 МЕ).

2. ХГ (200 МЕ) способен избирательно угнетать либо М-АОК, либо G-АОК. Такая селективность зависит от времени воздействия гормона относительно момента повторной иммунизации.

3. ХГ (200 МЕ) снижает клеточность селезенки, на территории которой формируются АОК при вторичном иммунном ответе.

4. Иммуномодулирующее влияние ХГ на процессы формирования вторичного иммунного ответа не зависит от половых стероидов яичников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Димитров Д. Я. Хориальный гонадотропин человека: Пер. с болг.— М., 1979.
2. Кеворков Н. Н., Ширшев С. В., Князев Ю. А. // Пробл. эндокринол.— 1988.— № 6.— С. 79—83.
3. Милер И. Иммуитет человеческого плода и новорожденного.— 1-е изд.— Прага, 1983.
4. Трунова Л. А. Иммунология репродукции.— Новосибирск, 1984.

5. Ширшев С. В., Кеворков Н. Н. // Успехи соврем. биол.— 1991.— Т. 3, № 5.— С. 683—697.
6. Dresser D. W., Wortis H. H. // Nature.— 1965.— Vol. 208, N 5013.— P. 859—861.
7. Han T. // J. Immunol.— 1975.— Vol. 29, N 3.— P. 509—515.
8. Jerne N. K., Nordin A. A. // Science.— 1963.— Vol. 140, N 3365.— P. 405—405.
9. Kevorkov N. N., Shilov Ju. I., Shirshov S. V. // Brain Behav. Immun.— 1991.— Vol. 5.— P. 149—161.
10. Seigler H. F., Metzgar R. S. // Transplantation.— 1970.— Vol 9.— P. 478—486.
11. Sulke A. N., Jones D. B., Wood P. J. // J. Reprod. Immunol.— 1985.— Vol. 7, N 2.— P. 105—110.
12. Wide L. // Acta endocr. (Kbh.).— 1962.— Suppl. 70.— P. 1—100.

Поступила 30.06.92

S. V. Shirshov — CHORIONIC GONADOTROPIN EFFECT ON SECONDARY IMMUNE RESPONSE FORMATION

Experiments were carried out *in vivo* and *in vitro*. Secondary immune response to sheep red cells was assessed on day 5 after repeated immunization by IgM and IgG antibody-producing cells. Chorionic gonadotropin was injected after reimmunization to intact and ovariectomized animals in doses compatible to those in normal pregnancy. *In vitro* chorionic gonadotropin was added for one h into sensitized splenocyte cultures and then its effects were assessed in syngeneic transfer system by the same parameters. Experiments have demonstrated that in dose 40 MU chorionic gonadotropin cannot influence secondary immune response formation. All hormonal effects are related to 200 MU dose extrapolated from the maximal level of this hormone during pregnancy. In this dose gonadotropin reduced splenocyte counts and inhibited the formation of IgG-antibody-producing cells. Ovarian sex steroids do not mediate chorionic gonadotropin immunomodulating effects. An hour's contact of sensitized splenocytes with the hormone in a high dose resulted in a statistically significant inhibition of the formation of IgM-antibody-producing cells. Hence, if chorionic gonadotropin interacted with immunocompetent cells before their repeated contact with the antigen, IgM-antibody-producing cells suffer, and if this exposure occurs after this contact, IgG-antibody-producing cells decrease in number. The role of chorionic gonadotropin in development of normal pregnancy and that complicated by immunopathologic processes is discussed.

© Т. М. МИШУНИНА, В. Я. КОНОНЕНКО, 1993

УДК 616.433-008.6-07: [616.154:577.175.53+616.154:577.175.325]-092.9

Т. М. Мишунина, В. Я. Кононенко

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГАМК МЕМБРАНАМИ АДЕНОГИПОФИЗА КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЕЙ КОРТИКОСТЕРОИДОВ И АКТГ В ОРГАНИЗМЕ

Лаборатория нейрoхимии (руководитель — доктор мед. наук В. Я. Кононенко) Украинского НИИ эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко (дир.— член-корр. АН Украины Н. Д. Трoнько) Минздрoва Украины

Несмотря на то что факт участия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в регуляции секреции АКТГ можно считать доказанным, многие вопросы, относящиеся к механизмам реализации ингибиторного ГАМК-ергического контроля функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), остаются невыясненными. Один из них — вопрос о роли ГАМК в процессах регуляции секреции АКТГ кортикостероидами по принципу обратной связи. Предполагают, что кортикостероиды могут ингибировать секрецию АКТГ, изменяя синтез ГАМК [8]. Ранее нами при экспериментальном моделировании различного уровня кортикостероидов и АКТГ в организме крыс было показано изменение синтеза,

метаболизма, а также транспорта медиатора синапсомами гипоталамуса [4, 5], что, несомненно, играет определенную роль в процессах регуляции кортикостероидами секреции АКТГ на уровне гипоталамуса. Особое значение при этом имеет состояние рецепторов ГАМК с учетом их центральной роли в молекулярных механизмах гуморальной регуляции физиологических процессов [7]. Установлено существенное влияние кортикостероидов и АКТГ на уровень специфического связывания ³H-ГАМК синаптическими мембранами гипоталамуса [6]. Роль ГАМК-рецепторов аденогипофиза в механизмах регуляции кортикостероидами секреции АКТГ неизвестна.

Авторадиографическими, электрофизиологиче-