

УДК 612.018.2:612.017.12

С. В. Ширшев, Б. А. Бахметьев, О. Л. Горбунова

РОЛЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ГОРМОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ КЛЕТОЧНООПОСРЕДОВАННЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

В эксперименте на мышах-самках породы Swiss изучалось влияние хорионического гонадотропина (ХГ) на гуморальные и клеточноопосредованные иммунные реакции. Оценка действия ХГ проводилась с учетом этапов иммунных реакций. Исследовалось формирование антителообразующих клеток (АОК) и реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), а также уровень ядродержащих клеток (ЯСК) в периферической крови, селезенке и перитонеальной полости. При изучении влияния ХГ на антигеннезависимом этапе иммунного ответа выявлено снижение АОК в селезенке и стимуляция реакции ГЗТ. На антигензависимом этапе формирования иммунных реакций низкая доза ХГ селективно повышала образование АОК в селезенке, в то время как реакцию ГЗТ стимулировали обе дозы гормона. При одновременном исследовании действия ХГ как на антигеннезависимом, так и на антигензависимом этапах формирования иммунокомпетентных клеток наблюдалась только стимуляция процессов формирования АОК в селезенке. С учетом того что эксперименты проведены на некастрированных самках, полученные результаты являются не только эффектами ХГ, но и его совместного действия с половыми стероидными гормонами.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, половые стероиды, гиперчувствительность замедленного типа, антителообразующие клетки

Беременность у млекопитающих и человека представляет собой сложную цепь событий, включающую в себя оплодотворение с последующим формированием и имплантацией бластоцисты, плацентацию, развитие плода и рождение ребенка [4, 5]. На каждом из указанных этапов функционирует сложный комплекс внутрисистемных взаимодействий, благодаря которому происходит успешное формирование эмбриона. Важную роль в этом процессе играют иммунные механизмы [11, 13]. Помимо этого процессы гестации находятся под контролем нейроэндокринной системы, которая, в частности, контролирует функциональную активность иммунокомпетентных клеток матери.

Иммунная система беременных женщин претерпевает изменения, связанные с ослаблением клеточноопосредованных иммунных реакций (Th1) и усилением гуморального звена иммунитета (Th2), так как Th1-ответ может приводить к спонтанному аборт [9].

Наиболее важным гестационным гормоном является хорионический гонадотропин (ХГ), который синтезируется плацентой и протектирует развитие беременности [1]. Известно, что ХГ активизирует процессы стероидогенеза в яичниках и плаценте, поэтому введение ХГ небеременным мышам-самкам также приводит к выраженной лютеиновой реакции и выработке яичниками эстрогенов [7]. Показано, что разнонаправленность эффектов ХГ *in vivo* связана с гиперпродукцией эндогенных половых стероидов [8]. Так, эстрадиол в сочетании с ХГ в дозах, отражающих концентрации каждого из использованных гормонов в I или III

триместры беременности, полностью снимает иммунодепрессивную активность ХГ и одновременно утрачивает свое иммуномодулирующее действие [2, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ХГ-индуцированного гормонального фона на формирование гуморальных иммунных реакций в антигеннезависимый и антигензависимый этапы становления иммунного ответа.

Методика. Опыты проведены на 90 половозрелых мышах-самках породы Swiss массой 20–22 г. Животные были разделены на 3 группы: первая – контрольная; животным инъецировали растворитель гормона. Двум другим группам вводили подкожно через день инъекции ХГ в 2-х дозах, экстраполированных со средних концентраций гормона в сыворотке крови беременных женщин в I и II–III триместры, которые составили 200 и 20 МЕ/мышь соответственно [17].

Для оценки влияния ХГ на отдельные этапы формирования гуморальных и клеточноопосредованных иммунных реакций были проведены 3 серии экспериментов. В первой изучали влияние гормона на антигеннезависимый этап иммунного ответа. Для этого мышам ХГ вводили в течение 5 суток до иммунизации (3 инъекции). Во второй серии изучали влияние гормона на антигензависимый этап иммунного ответа; для этого гормон вводили по аналогичной схеме, но после иммунизации. В третьей серии исследовали влияние ХГ на антигеннезависимый и антигензависимый этапы иммунного ответа. Гормон вводили как до, так и

после иммунизации курсом 5 инъекций в течение 10 суток.

Во всех трех схемах эксперимента гуморальные и клеточноопосредованные иммунные реакции оценивались одномоментно, для чего мышей иммунизировали внутрибрюшинно эритроцитами барана (ЭБ) в концентрации 10^8 клеток. Через 4 дня в стопу вводили разрешающую дозу ЭБ 5×10^7 для формирования реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Через 24 часа животных выводили из эксперимента (строго в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных", утвержденными приказом Минздрава СССР) и оценивали реакцию ГЗТ и уровень антителообразующих клеток (АОК) в селезенке.

Реакцию ГЗТ учитывали, измеряя величину отека стопы в сравнении с интактной стопой. Разница в толщине характеризовала выраженность реакции ГЗТ [15]. Уровень АОК определяли прямым методом локального гемолиза в геле агарозы по Ерне [14]. Кроме этого, у всех экспериментальных животных исследовали уровень ядродержащих клеток (ЯСК) в периферической крови, селезенке и перитонеальной полости.

Все результаты подвергались статистической обработке с использованием непарного t-критерия Стьюдента и корреляционного анализа по Пирсону [3].

Результаты. Введение хориогонина на антигеннезависимом этапе формирования иммунных реакций приводило к угнетающему дозозависимому эффекту гормона на образование АОК и параллельно дозозависимо стимулировало реакцию ГЗТ (табл.1). Корреляционный анализ выявил отрицательную связь между численностью АОК и выраженностью реакции ГЗТ ($r = -0,7671$; $p < 0,02$). Учитывая, что в контрольной группе не обнаружена достоверная корреляция, можно говорить о реципрокном действии гормона на формирование гуморальных и клеточноопосредованных реакций. Инъекции ХГ дозозависимо повышали количество ЯСК в селезенке и перитонеальной поло-

сти, одновременно снижая уровень лейкоцитов в периферической крови.

Введение ХГ на антигензависимом этапе иммуногенеза выявили оппозитные эффекты хориогонина по сравнению с антигеннезависимым этапом (табл. 2). Так, введение ХГ в концентрации 20 МЕ/мышь вызывало статистически достоверное усиление гуморального иммунного ответа, а высокая доза гормона (200 МЕ/мышь) не оказывала статистически значимого иммуномодулирующего эффекта. На реакцию ГЗТ, как и на антигеннезависимом этапе, гормон оказывал дозозависимое стимулирующее действие. Поскольку корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между ГЗТ и АОК ($r = 0,3557$; $p > 0,05$), можно предположить, что на фоне антигенного воздействия ХГ одномоментно активировал как гуморальные, так и клеточноопосредованные реакции. Параллельно гормон снижал число ЯСК во всех исследуемых компартментах иммунной системы, причем на уровне селезенки и периферической крови данным эффектом обладала низкая доза гормона (20 МЕ/мышь), а в перитонеальной полости – высокая (200 МЕ/мышь).

Введение гормона как на антигеннезависимом, так и на антигензависимом этапах дифференцировки иммунокомпетентных клеток оказывало стимулирующее действие на образование АОК в селезенке, однако в отличие от первых экспериментов данный эффект не зависел от дозы ХГ. В то же время на реакцию ГЗТ введение гормона не оказывало статистически значимого влияния (табл. 3). Инъекции ХГ повышали число ЯСК в периферической крови, селезенке и перитонеальной полости. Следует отметить, что в крови и селезенке повышение клеточности не зависело от дозы вводимого гормона, а в перитонеальной полости было дозозависимым. Корреляционный анализ не обнаружил достоверных взаимосвязей между данными показателями ($p > 0,05$).

Заключение. Таким образом, выявленные разнотипные эффекты хориогонина можно объяснить не только его дозами и этапом диффе-

Таблица 1

Влияние ХГ на антигеннезависимый этап формирования гуморальных и клеточноопосредованных иммунных реакций ($M \pm m$)

Гр.	Эксперимент. воздействие	АОК на орган	ГЗТ разница (мм)	ЯСК селезенки	ЯСК крови	ЯСК перит. пол.
1	Контроль (растворитель гормона) n=10	70300 ± 3312	$0,56 \pm 0,02$	$353,3 \pm 9,13$	$12,3 \pm 0,11$	$9,8 \pm 0,6$
2	ХГ (20МЕ/мышь) n=10	58296 ± 2126 $p_{(2-1)} < 0,05$	$0,72 \pm 0,01$ $p_{(2-1)} < 0,05$	$445,3 \pm 29,3$ $p_{(2-1)} < 0,05$	$11,0 \pm 0,2$ $p_{(2-1)} < 0,05$	$16,7 \pm 0,5$ $p_{(2-1)} < 0,05$
3	ХГ (200МЕ/мышь) n=10	43700 ± 1914 $p_{(3-1)} < 0,05$; $p_{(3-2)} < 0,05$	$0,83 \pm 0,02$ $p_{(3-1)} < 0,05$; $p_{(3-2)} < 0,05$	$569,3 \pm 34,9$ $p_{(3-1)} < 0,05$; $p_{(3-2)} < 0,05$	$8,9 \pm 0,2$ $p_{(3-1)} < 0,05$; $p_{(3-2)} < 0,05$	$26,6 \pm 1,2$ $p_{(3-1)} < 0,05$; $p_{(3-2)} < 0,05$

Примечание. Здесь и далее n – количество животных в группе.

Таблица 2

Влияние ХГ на антигензависимый этап формирования гуморальных и клеточноопосредованных иммунных реакций ($M \pm m$)

Гр.	Эксперимент. воздействие	АОК на орган	ГЗТ разни́ца (мм)	ЯСК селезенки	ЯСК крови	ЯСК перит. пол.
1	Контроль (растворитель гормона) n=10	61685±3422	0,52±0,02	413,3±6,31	16,9±1,6	14,2±2,3
2	ХГ (20МЕ/мышь) n=10	82850±5879 $P_{(2-1)} < 0,05$	0,72±0,01 $P_{(2-1)} < 0,05$	362,0±5,4 $P_{(2-1)} < 0,05$	11,5±0,4 $P_{(2-1)} < 0,05$	21,6±6,1 $P_{(2-1)} > 0,05$
3	ХГ (200МЕ/мышь) n=10	70400±3288 $P_{(3-1)} > 0,05$; $P_{(3-2)} > 0,05$	0,89±0,02 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} < 0,05$	531,8±21,1 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} < 0,05$	14,2±0,3 $P_{(3-1)} > 0,05$; $P_{(3-2)} < 0,05$	9,2±1,1 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} < 0,05$

Таблица 3

Влияние ХГ на антигеннезависимый и антигензависимый этапы формирования гуморальных и клеточноопосредованных иммунных реакций ($M \pm m$)

Гр.	Эксперимент. воздействие	АОК на орган	ГЗТ разни́ца (мм)	ЯСК селезенки	ЯСК крови	ЯСК перит. пол.
1	Контроль (растворитель гормона) n=10	39933±1904	0,56±0,03	265,0±10,3	6,9±0,3	11,2±0,7
2	ХГ (20МЕ/мышь) n=10	75888±3258 $P_{(2-1)} < 0,05$	0,57±0,04 $P_{(2-1)} > 0,05$	415,6±17,7 $P_{(2-1)} < 0,05$	8,9±0,1 $P_{(2-1)} < 0,05$	20,4±1,0 $P_{(2-1)} < 0,05$
3	ХГ (200МЕ/мышь) n=10	68187±4945 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} > 0,05$	0,54±0,04 $P_{(3-1)} > 0,05$; $P_{(3-2)} > 0,05$	416,3±20,5 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} > 0,05$	9,4±0,3 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} > 0,05$	28,0±1,56 $P_{(3-1)} < 0,05$; $P_{(3-2)} < 0,05$

ренцировки иммунокомпетентных клеток в момент гормонального воздействия, но и индуцированными им женскими половыми стероидами. Угнетение гуморальных и стимуляция клеточноопосредованных иммунных реакций на антигеннезависимом этапе иммуногенеза указывает на реципрокный механизм действия ХГ-индуцированного гормонального фона в отношении типа иммунного ответа. На антигензависимом этапе иммунных реакций ХГ активирует формирование как гуморальных, так и клеточноопосредованных реакций, что свидетельствует о коактивирующем действии гормона и индуцированного им стероидного фона по отношению к антигенной стимуляции. При постоянном введении ХГ как на антигеннезависимом, так и на антигензависимом этапах становления иммунного ответа гонадотропин стимулирует гуморальные и не влияет на клеточноопосредованные реакции. Поскольку корреляционный анализ не обнаружил взаимосвязи между изменением ЯСК в изучаемых компартментах иммунной системы, уровнем АОК и реакцией ГЗТ, наблюдаемые изменения клеточности, по-видимому, связаны с непосредственным гормональным влиянием на лейкопоэз и не являются эффектами перераспределения клеток.

С учетом того что ХГ начинает продуцироваться клетками трофобласта с момента имплантации яйцеклетки еще до экспрессии молекул гис-

тосовместимости отца, вплоть до родов [10, 12], данные, полученные при введении ХГ как на антигеннезависимом, так и на антигензависимом этапах формирования иммунного ответа, свидетельствуют о том, что ХГ создает условия повышенной реактивности гуморальных иммунных реакций матери и не влияет на клеточноопосредованные. Известно, что клеточноопосредованные реакции, в частности ГЗТ, оказывают негативное действие на фетоплацентарный комплекс как посредством продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-2, TNF α , INF γ), так и непосредственно принимая участие в иммунной деструкции плацентарных клеток [6, 9, 16]. Таким образом, ХГ и индуцированные им эндогенные половые стероиды создают условия для преобладания Th2-ответов над Th1 в период физиологически протекающей беременности и являются одними из факторов иммунотрофизма [16].

ROLE OF REPRODUCTION HORMONES IN FORMATION OF CELL-MEDIATED AND HUMORAL IMMUNE REACTIONS

S.V. Shirshov, B.A. Bachmetyev, O.L. Gorbunova

The influence of chorionic gonadotropin (CG) on humoral and cell-mediated immune reactions was studied in the experiment with Swiss female mice. The assessment of CG effect was made while considering the stages of the immune reactions. The formation of antibody-forming cells (AFC)

and delayed-type hypersensitivity reaction (DTH), and also the level of nucleated cells (NC) in peripheral blood, spleen, and peritoneal cavity were examined. AFC lowering in spleen and stimulation of DTH reaction were detected at antigen-independent stage of the immune response. CG in low dose selectively elevated the AFC formation in spleen at antigen-dependent stage of the immune response, whereas DHT reaction was stimulated by both hormone doses. Under the concurrent examination of CG effect both at antigen-independent and antigen-dependent stages of immunocompetent cell formation only the stimulation of AFC formation in spleen was observed. Considering that the experiments were made with non-ovariectomized females the results obtained appear to be both as the manifestation of CG effects and its joint action with sex steroid hormones.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дмитров Д.Я.* Хориальный гонадотропин человека: Пер. с болг. М., 1979. 143 с.
2. *Кеворков Н.Н., Шириев С.В.* // Пробл. эндокринологии. 1987. Т. 33. № 2. С. 60–62.
3. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. М., 1999. 459 с.
4. *Трунова Л.А.* Иммунология репродукции. Новосибирск, 1984. 157 с.
5. *Хаитов Р.М., Вербицкий М.Ш.* // Итоги науки и техники ВИНТИ. 1986. Т. 14. С. 1–165.
6. *Шириев С.В.* // Успехи современной биологии. 1994. Т. 114. № 2. С. 223–237.
7. *Шириев С.В.* Механизмы иммуномодулирующего действия гормонов репродукции. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1996.
8. *Шириев С.В.* // Успехи современной биологии. 1998. Т. 118. № 1. С. 69–85.
9. *Шириев С.В.* Механизмы иммунного контроля процессов репродукции. Екатеринбург, 1999. 381 с.
10. *Cross J.C., Werb Z., Fisher S.J.* // Science. 1994. Vol. 266. P. 1508–1512.
11. *Gotlieb W.H.* // Rev. Med. Bruxelles. 1992. Vol. 13. P. 97–101.
12. *Hill J.A.* // Am. J. Reprod. Immunol. 1990. Vol. 22. P. 33–39.
13. *Hulkower K.* // Einstein Quart. 1990. Vol. 8. P. 116–120.
14. *Jerne N.K., Nordin A.A.* // Science. 1963. Vol. 140. P. 405–405.
15. *Ohmichi Y., Momoto K., Ymada N., Takeya K.* // Immunology. 1976. Vol. 31. P. 101–110.
16. *Wegmann T.G.* // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 1987. Vol. 15. P. 67–70.
17. *Wide L.* // Acta Endocrinol. 1962. Vol. 41. P. 1–100.