

ПЕРМИНОВА Ольга Михайловна

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛЕСТЕРИНА
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК**

14.00.36 - Аллергология и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск - 1999

Работа выполнена в Институте клинической иммунологии СО РАМН.

Научный руководитель: член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор В.А.Козлов

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук К.В.Гайдуль

доктор медицинских наук Е.Б.Меньщикова

Ведущая организация: Государственный научный центр РФ - Институт иммунологии Министерства здравоохранения России, г. Москва

Защита состоится " ____ " _____ 1999 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.01.01 (аллергология и иммунология) при Институте клинической иммунологии СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института клинической иммунологии СО РАМН.

Автореферат разослан "19" *марта* 1999 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук *Кудаева* О.Т.Кудаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из важнейших проблем современной иммунологии является поиск новых иммуномодулирующих препаратов, позволяющих осуществлять коррекцию различных иммунопатологических состояний. Перспективным направлением в этом поиске можно считать исследование классов веществ, представляющих собой эндогенные физиологические регуляторы иммунологических процессов. С этой точки зрения заслуживают внимания представители различных классов липидов и продукты липидного метаболизма, являющиеся нормальными физиологическими компонентами клеток и в то же время, как известно, обладающие заметными иммуномодулирующими свойствами. В последние годы проведены многочисленные исследования и накоплены экспериментальные данные, доказывающие влияние на функциональную активность иммунокомпетентных клеток (ИКК) различных классов липопротеинов, в т.ч. эндогенно окисленных ЛПНП (Adams D.O. et al., 1995; Wiklund O. et al., 1996; Nilsson J. et al., 1996), наличие иммуносупрессорной активности у апопротеина Е (Kelly M.E. et al., 1994; Clay M.A. et al., 1995; Поляков Л.М. и др., 1998), иммуномодулирующие свойства жирных кислот и продуктов их окислительного метаболизма (Libermann T.A. et al., 1994; Poli G. et al., 1996; Gulino A. et al., 1996). Такие регуляторы иммунных реакций могут не только влиять на их интенсивность, но и модулировать направление иммунного ответа, воздействуя, в частности, на соотношение Т-хелперов 1-го и 2-го типа (Voumpas D.T. et al., 1996; Hansson G.K. et al., 1998), изменять состав популяций ИКК, регулируя процессы их пролиферации (Bjorkerud B. et al., 1996; Viora M. et al., 1997) и апоптоза (Hardwick S.J. et al., 1996; Yang X. et al., 1996).

Оксистеролы (ОС) представляют собой обширный класс липидных метаболитов, которые, как установлено в последние десятилетия, обладают выраженным влиянием на различные клеточные функции (пролиферацию, апоптоз, липидный обмен, состояние клеточных мембран, экспрессию мембранных белков и т.д.) и являются при этом естественными продуктами окисления холестерина (ХС) в клетках, что обеспечивается специальной ферментативной системой цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (Smith L.L. et al., 1989;

Axelsson M. et al., 1995, 1996; Guardiola F. et al., 1996; Harada K. et al., 1997; Brown A.J. et al., 1998, 1999). Сегодня нет сомнений в том, что ОС являются важными эндогенными регуляторами клеточной активности как в норме, так и при различных патологиях. Из литературы известно также, что отдельные представители класса ОС обладают иммуномодулирующими эффектами (Richert L. et al., 1986; Moog C. et al., 1990, 1991; Lahoua Z. et al., 1994; Wiklund O. et al., 1996, 1998; Karlsson A.-L.K. et al., 1998). Однако, данные о влиянии ОС на функциональную активность ИКК немногочисленны и отрывочны и не дают цельного представления об их роли в регуляции иммунных реакций.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было исследование влияния ОС на функциональную активность двух основных типов ИКК - макрофагов (Мф) и лимфоцитов (Лф) и возможное обратное воздействие продуцируемых ИКК цитокинов на процессы липидного метаболизма в этих клетках. Соответственно были сформулированы задачи исследования:

1. Изучить возможность иммуномодулирующего эффекта ОС на модели клеточного иммунного ответа *in vitro*.
2. Исследовать эффекты воздействия ОС на общепринятые показатели функциональной активности Мф.
3. Оценить влияние ОС на продукцию лимфокинов активированными Лф.
4. Оценить изменение липидного метаболизма Мф при действии комплекса монокинов, содержащихся в средах, кондиционированных ЛПС-активированными Мф, и рекомбинантного фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α).
5. В условиях *in vitro* изучить влияние лимфокинов, выделяемых активированными Лф, на параметры липидного обмена в Мф.

Научная новизна результатов. В данной работе впервые в экспериментах *in vitro* показано ингибирующее действие ОС - 25-гидроксихолестерина (25-ОХС) и 7-кетохолестерина (7-КХС) - на такие показатели функциональной активности Мф, как комитогенная активность и скорость генерации активированных кислородных метаболитов (АКМ). Кроме того, экспериментально доказано, что влияние ОС на функциональную активность Лф человека и мыши, проявляющееся в подавлении иммунного ответа на модели одно- и двунаправленной смешанной культуры мононуклеаров периферической крови здоровых

доноров, не ограничивается прямым антипролиферативным эффектом, а включает в себя супрессию продукции лимфокинов с макрофаг-активирующей и индуцирующей экспрессию молекул ГКГС II класса активностью. Получены новые данные о влиянии цитокинов, продуцируемых активированными ИКК, на процессы обмена ХС и триглицеридов (ТГ) в перитонеальных Мф *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты экспериментов расширяют представления о роли ОС в регуляции иммунных реакций и свидетельствуют о том, что метаболизм ХС в ИКК, находящийся под контролем выделяемых этими клетками цитокинов и определяющий интенсивность образования ОС с иммуномодулирующими свойствами, является существенным фактором в регуляции функциональной активности Мф и Лф и взаимодействия между ними в процессах иммуногенеза. Полученные данные имеют не только теоретическое, но и практическое значение, т.к. подтверждают возможность использования ОС как нового перспективного класса физиологических иммуномодуляторов стероидной природы.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на I Съезде иммунологов России, Новосибирск, 1992; на 12-ом Европейском иммунологическом конгрессе, Барселона, 1994; на отчетных научных конференциях Института клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, 1993, 1996.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на *172* страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 20 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 разделов, содержащих результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и выводов. Библиография включает *327* источников, из них *30* на русском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проведены на мышах-самцах линий СВА и С57В1, а также мышах (СВА х С57В1)F₁. Животных получали из вивария СО РАМН, использовали в возрасте 3-4 месяцев и содержали на стандартной сбалансированной диете.

Перитонеальные Мф мыши получали общепринятым методом (Учитель И.Я., 1978) на 4-е сутки после внутрибрюшинного введения 1,0 мл тиогликолевого бульона. Дальнейшая инкубация Мф производилась в пластиковых планшетах или чашках Петри (d=35 мм) в течение 1,5 часов в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 2мМ глутамина и 50мкг/мл гентамицина, в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C. Далее монослой Мф отмывали от неприлипающих клеток и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят или 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Исследуемые стеролы растворяли в этаноле и добавляли в среду инкубации в различных концентрациях.

Мононуклеарные клетки (МК) выделяли из стабилизированной ЭДТА венозной крови доноров центрифугированием на градиенте фиколла-верографина (d = 1,078 г/см³). Донорами являлись 8 мужчин и 6 женщин - практически здоровые сотрудники СО РАМН в возрасте 25-45 лет.

Интенсивность FcγR-опосредованного фагоцитоза опсонизированных эритроцитов барана (ЭБ) перитонеальными Мф мыши оценивали спектрофотометрическим методом после лизиса фагоцитов в 1% растворе додецилсульфата Na. Оптическую плотность определяли на 8-канальном спектрофотометре "MULTISCAN" при λ = 405 нм (Rummage J.A. et al., 1985).

Скорость генерации АКМ оценивалась по интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) Мф в присутствии опсонизированного зимозана (2 мг/мл) на 2-канальном хемилюминометре "ФОТОН" (Muto S. et al., 1986).

Комитогенную активность ЛПС-активированных перитонеальных Мф мыши оценивали по интенсивности включения [³H]-тимидина в культуре пролиферирующих тимоцитов мыши при одновременном добавлении Кон А (1 мкг/мл) и сред, кондиционированных ЛПС-активированными Мф (Phillips R. et al., 1983).

Продукция митоген-стимулированными спленоцитами мыши комплекса цитокинов, обладающих макрофаг-активирующим эффектом, оценивалась с помощью модифицированного хемилюминесцентного метода (Muto S. et al., 1988; Любимов Г.Ю. и др., 1995), основанного на способности сред, кондиционированных Кон А -стимулированными спленоцитами, вызывать активацию перитонеальных Мф мыши в тест-системе (по интенсивности дыхательного взрыва, вызванного зимозаном).

Продукция антиген-стимулированными Лф комплекса цитокинов, индуцирующих экспрессию молекул ГКГС II класса на клеточных мембранах, определялась с помощью метода, разработанного ранее для Лф мыши (Селедцов В.И. и др., 1987). Активность цитокинов в средах, кондиционированных 48-часовой двунаправленной смешанной культурой МК человека, оценивали по их способности индуцировать в течение 96 часов увеличение количества HLA-DR-позитивных Мф в тест-системе, что определяли (Мусатов М.И. и др., 1987) по включению трипанового синего после комплементзависимого порирования с использованием моноклональных антител к неполиморфным детерминантам HLA-DR (ИКО-1, Онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН).

Для оценки интенсивности клеточной пролиферации была использована однонаправленная смешанная культура МК периферической крови доноров. Клетки-стимуляторы обрабатывались митомицином С (25 мкг/мл), соотношение их с клетками-респондерами составляло 1:1. Культивирование осуществляли с использованием 20% пулированной АВ(IV) сыворотки. Результаты учитывали к концу 6-х суток по включению [³H]-тимидина в ДНК отвечающих пролиферацией клеток. Эксперименты проводились совместно с сотрудником ИКИ СО РАМН М.И. Мусатовым.

Среды, кондиционированные активированными перитонеальными Мф мыши, получали после 24-часовой преинкубации Мф с липополисахаридом (ЛПС) E.colli O111:B4 (20 мкг/мл).

Среды, кондиционированные активированными спленоцитами мыши, получали либо после 48-часовой преинкубации спленоцитов с конканавалином А (5 мкг/мл), либо от первичной двухсуточной двунаправленной смешанной культуры спленоцитов мышей линий СВА и С57В1.

Скорость биосинтеза эфиров холестерина (ЭХС) и триглицеридов (ТГ) в перитонеальных Мф мыши оценивали по скорости включения [^{14}C]олеата в ЭХС и ТГ, [^3H]ХС в ЭХС и [^3H]глицерина в ТГ (Brown et al., 1980). Для этого Мф инкубировали в течение 4-х часов в среде RPMI-1640, содержащей 0,2% БСА и 0,2 мМ [^{14}C]олеата, связанного с БСА (или 0,2 нМ [^3H]ХС, связанного с БСА, или 4 нМ глицерина, растворенного в этаноле). Клеточные липиды экстрагировали *in situ* смесью гексан : изопропанол (3:2, V/V), концентрировали под током азота, растворяли в хлороформе и разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol в системах растворителей гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (60:40:1 и 90:10:1, V/V), используя соответствующие стандарты ЭХС и ТГ (Sigma) (Душкин М.И. и др., 1986). Пятна ЭХС и ТГ проявляли в парах йода, соскребали их в сцинтилляционные вials и подсчитывали радиоактивность в толуольном сцинтилляторе в сцинтилляционном счетчике Mark-III (Tracor Analytical, Голландия) по программам STD-1 ([^3H]) и STD-2 ([^{14}C]). Результаты выражали в нМ этерифицированного олеата и пМ этерифицированных ХС и глицерина на мг клеточного белка. Клеточный белок определяли по методу Лоури (Lowry H. et al., 1951) после экстракции липидов из Мф, используя в качестве стандарта БСА. Эксперименты проводились совместно с сотрудником НИИ терапии СО РАМН Душкиным М.И.

Статистическая обработка результатов включала вычисление средних величин и их ошибок и оценку значимости различий исследуемых показателей с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение.

Для решения поставленных задач в первой серии экспериментов было исследовано влияние ОС на общепринятые показатели функциональной активности перитонеальных Мф мыши (интенсивность Fc γ R-опосредованного фагоцитоза ЭБ, генерацию АКМ, комитогенную активность).

Интенсивность фотометрического сканирования,
 $\lambda=405$ нм, %

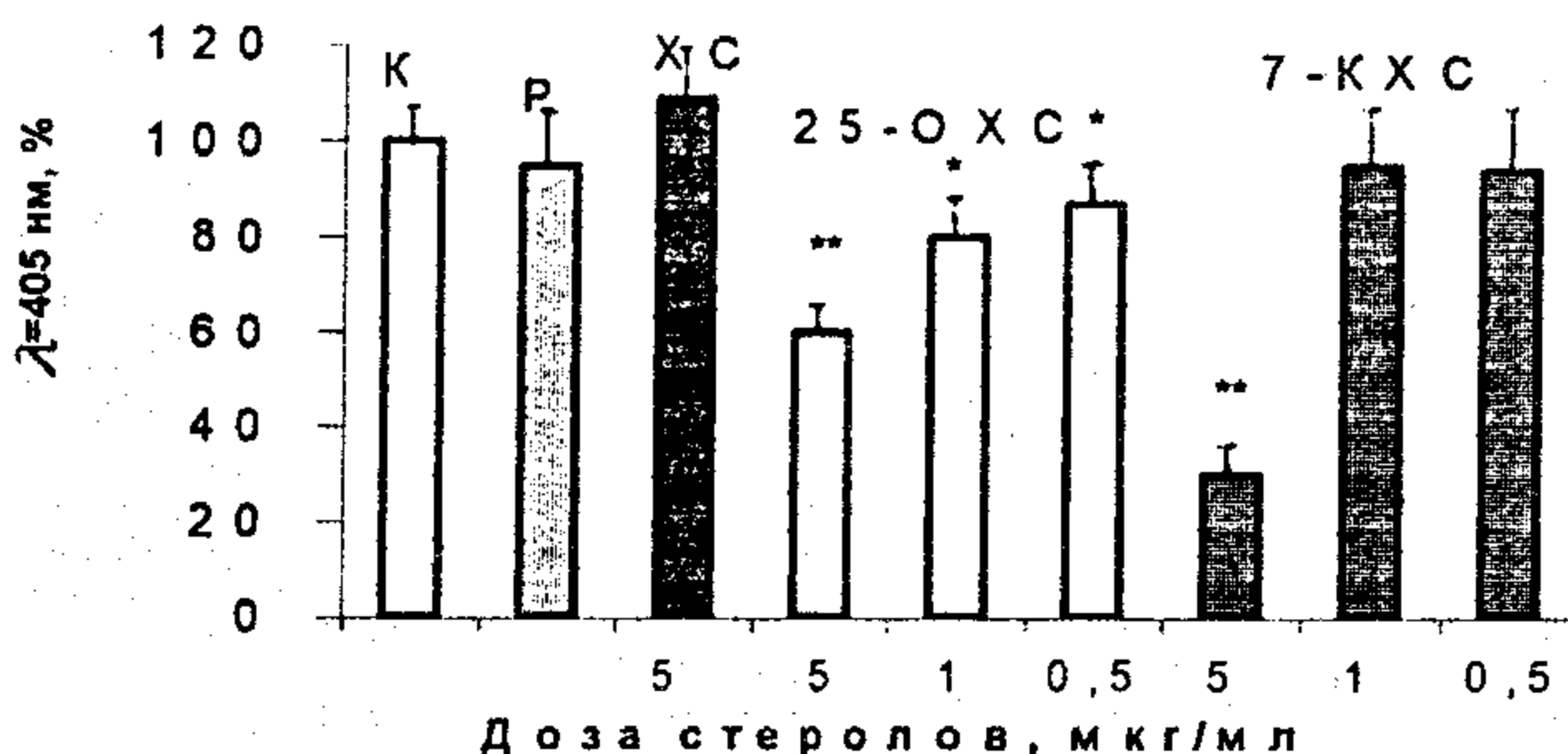


Рис. 1. Влияние оксистеролов на $Fc\gamma R$ -опосредованный фагоцитоз эритроцитов барана перитонеальными макрофагами мышей (СВА x С57В1) F_1 .

К – контроль, Р – растворитель (этанол), ХС – холестерин, 25-ОХС – 25-гидроксихолестерин, 7-КХС – 7-кетохолестерин.

* достоверное отличие ($P < 0,01$);

**достоверное отличие ($P < 0,001$).

24-часовая преинкубация Мф с ОС (25-ОХС и 7-КХС) приводила к подавлению фагоцитоза (рис.1). При этом эффект 7-КХС был более выраженным (максимальное ингибирование: 7-КХС - 70%, 25-ОХС – 40%). Снижение дозы 25-ОХС до 1 и 0,5 мкг/мл сопровождалось соответствующим уменьшением его ингибирующего влияния на фагоцитоз. Менее выражена дозовая зависимость подавляющего эффекта ОС на интенсивность фагоцитоза у 7-КХС. Непродолжительная по времени (2- и 6-часовая) преинкубация Мф с ОС не оказывала существенного влияния на фагоцитарную активность Мф.

Наиболее вероятным механизмом ингибирующего действия ОС на процессы фагоцитоза на сегодняшний день можно считать их влияние на метаболизм липидов клеточных мембран с изменением физико-химического состояния последних (Theunissen J.J. et al., 1986, 1996; Kauffman J.W. et al., 1986, 1991; Moog C. et al., 1991), а также влияние на образование активных липидных производных, в частности ПГЕ₂ (Lahoua Z. et al., 1991, 1994).

В следующей серии опытов было исследовано влияние ОС на способность перитонеальных Мф мыши генерировать АКМ. Определение продукции АКМ Мф широко используется как метод оценки их эффекторной и иммуноре-

гуляторной функций. Предварительно было установлено, что кратковременная (20 мин) преинкубация Мф с различными концентрациями ОС не влияет на величину стимулированного зимозаном "дыхательного взрыва" в Мф. Подавление (на 90%), стимулированной зимозаном продукции АКМ наблюдалось (рис. 2) после 24-часовой инкубации Мф с 7-КХС (в концентрации 5 мкг/мл). В отличие от 7-КХС, 25-ОХС не оказывает на эту функцию Мф заметного влияния. На величину спонтанной ХЛ Мф окисленные производные ХС влияния не оказывали. Такое явное различие эффектов 7-КХС и 25-ОХС можно связать со структурными особенностями их молекул, а именно с тем, что окисление в одном случае стерольного ядра, а в другом - боковой цепи молекулы ХС сопровождается различиями в мембранотропных свойствах данных ОС (Theunissen J.J. et al., 1986; Kauffman J.W. et al., 1986).

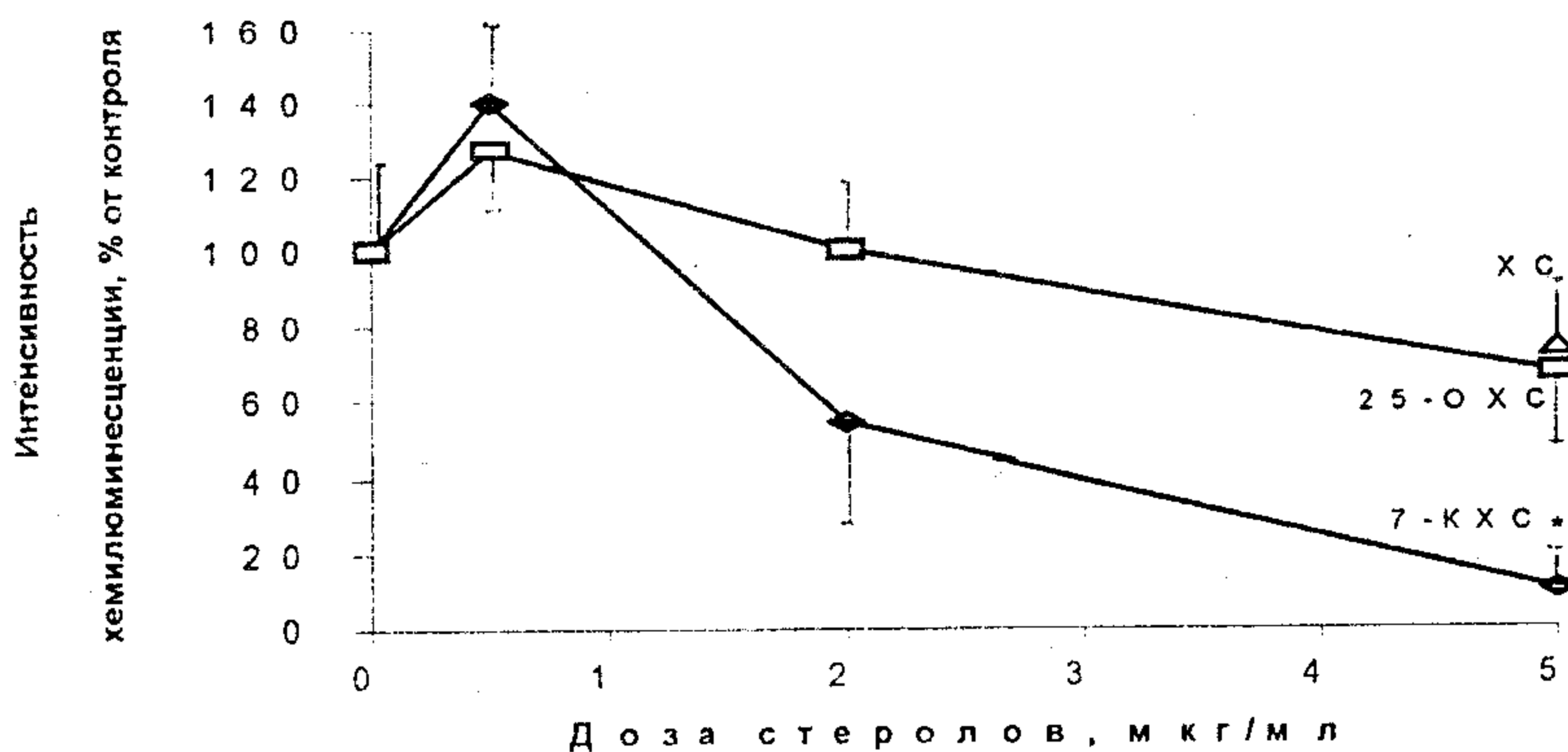


Рис.2. Влияние холестерина и его окисленных производных на индуцированную зимозаном продукцию активированных кислородных метаболитов перитонеальными макрофагами мышей (СВА х С57В1)F₁.

ХС – холестерин, 25-ОХС – 25-гидроксихолестерин, 7-КХС – 7-кетохолестерин.

*достоверное отличие (P<0,05).

Предположение о том, что ОС подавляют продукцию АКМ благодаря их мембранотропным свойствам, хорошо согласуется с многочисленными данными, свидетельствующими о модулирующем эффекте мембраноактивных веществ на продукцию АКМ (Cohen H.J. et al., 1981; Cronstein B.N. et al., 1989). Основным молекулярным механизмом, обеспечивающим продукцию АКМ, является, как известно, сложный ферментный комплекс, называемый NADPH-

оксидазой и локализованный в плазматической мембране Мф. Поэтому, наиболее вероятным механизмом действия ОС на активность NADPH-оксидазы нам представляется их влияние на свойства плазматических мембран, которое проявляется в нарушении сборки компонентов ферментативного NADPH-оксидазного комплекса в процессе его активации зимозаном и, в следствие этого, снижении продукции АКМ.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние ОС на комитогенную способность ЛПС-активированных перитонеальных Мф мыши в тест-системе с мышинными тимоцитами, обработанными субоптимальной дозой Кон А. Хорошо известно, что такой комитогенный эффект обусловлен, главным образом, ИЛ-1, хотя определенный вклад могут вносить и другие продуцируемые активированными Мф цитокины (Ярилин А.А. и др., 1997).

24-часовая преинкубация Мф с ОС приводит к снижению комитогенного эффекта сред, кондиционированных ЛПС-активированными Мф (рис.3). При этом влияние 25-ОХС более выражено и имеет отчетливую дозовую зависимость. Эффект 7-КХС заметен только при наибольшей из используемых нами доз (5 мкг/мл) и менее выражен, чем соответствующий эффект 25-ОХС.

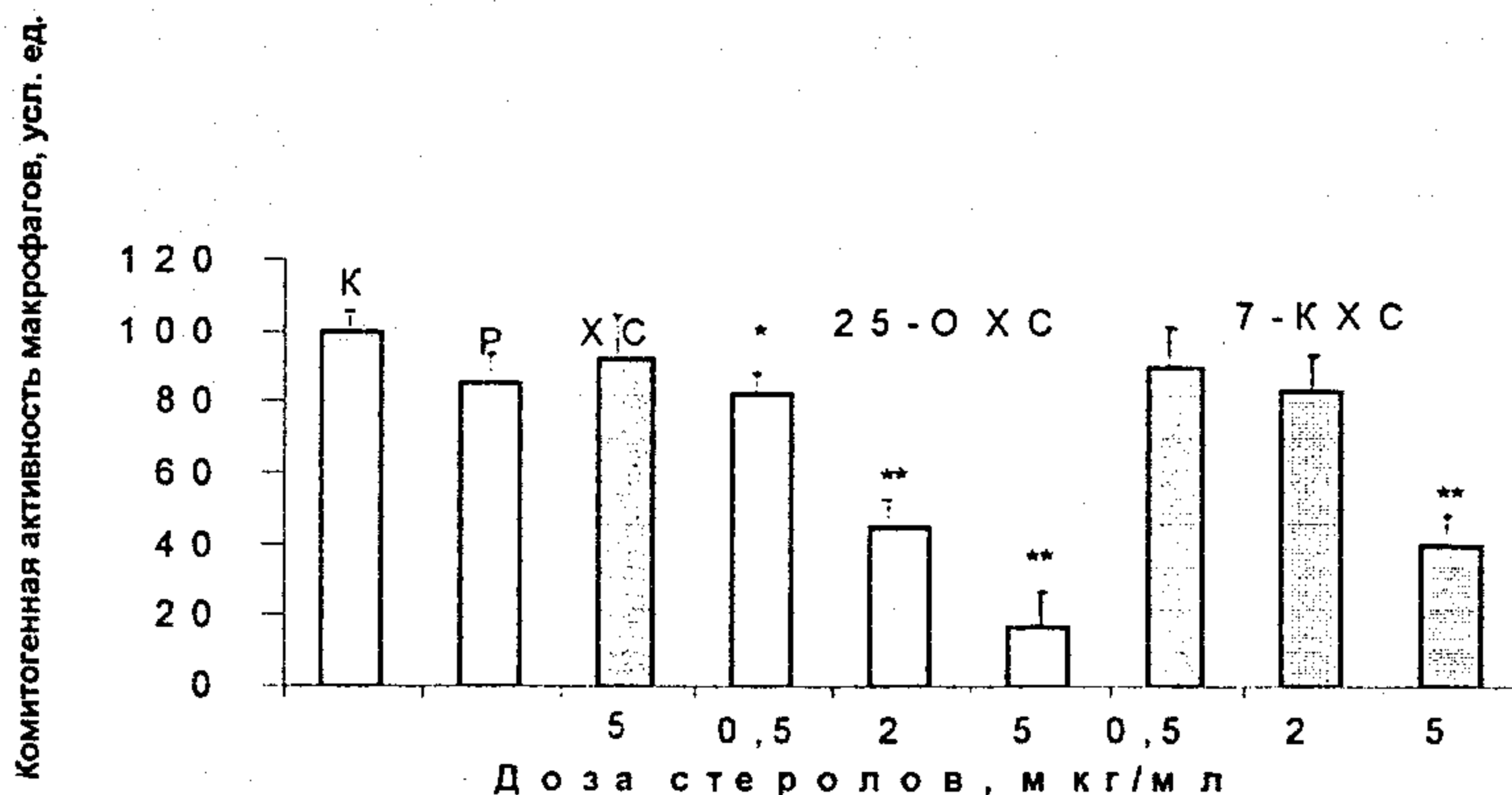


Рис.3. Влияние оксистеролов на комитогенную активность ЛПС-активированных перитонеальных макрофагов мышей (СВА x С57В1)F₁.

К – контроль, Р – растворитель (этанол), ХС – холестерин, 25-ОХС – 25-гидроксихолестерин, 7-КХС – 7-кетохолестерин.

* достоверное отличие (P<0,01);

**достоверное отличие (P<0,001).

Молекулярные механизмы, лежащие в основе такого влияния ОС, еще мало изучены. Обсуждается возможность их влияния на связывание с ДНК известных факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 (Wiklund O. et al., 1996), контролирующей экспрессию целого ряда генов, в т.ч. ИЛ-1 и ФНО- α .

Суммируя полученные данные, можно сказать, что изученные ОС способны существенно влиять на функциональную активность Мф, в том числе на выделение ими факторов, регулирующих взаимодействие этих клеток с Лф в процессах развития иммунных реакций.

Возможность непосредственного влияния ОС на функциональную активность Лф была исследована в следующей серии экспериментов. Используемая в наших опытах смешанная культура Лф (СКЛ), являясь физиологичной моделью иммунных реакций *in vitro*, позволяет изучить не только прямое воздействие ОС на участвующие в ней типы клеток (были использованы МК периферической крови доноров), но и оценить их эффект на возникающие в этой системе взаимодействия между ИКК.

Из литературы хорошо известно, что ОС ингибируют пролиферацию различных типов клеток, в т.ч. Лф, подавляя активность ОМГ-КоА-редуктазы - ключевого фермента синтеза ХС (Kandutsch A.A. et al., 1973, 1977; Bochelen D. et al., 1995; Choi J.W. et al., 1995). Поэтому заранее можно было предсказать, что ОС подавят пролиферативный ответ в СКЛ при прямом действии на отвечающие пролиферацией клетки, что и подтвердили наши предварительные опыты.

Чтобы выявить возможность непрямого действия ОС на пролиферирующие клетки, их эффект был изучен в опытах, где отвечающая и стимулирующая популяции МК были отдельно преинкубированы с ОС в течение суток, после чего клетки отмывались от избытка ОС и затем смешивались с соответствующей популяцией, не обработанной ОС. Представленные на рис.4(а,б) результаты этих опытов свидетельствуют о том, что ингибирующий эффект ОС проявляется не только при прямом действии ОС на отвечающие (пролиферирующие) МК (4а), но и при их воздействии на стимулирующие клетки, которые не пролиферируют сами, но влияют каким-то образом на пролиферирующие клетки, не подвергшиеся непосредственному воздействию ОС (4б), хотя этот эффект несколько ниже того, который возникает при непосредственном действии ОС на пролиферирующие клетки.

Опосредованный эффект ОС на пролиферацию Лф мог быть обусловлен изменением функциональной активности различных типов клеток, присутствующих в смешанной культуре МК (например, изменением активности Мф, как это было показано в вышеописанных опытах), но такими клетками могут быть и Лф. Влияние ОС на функциональную активность Лф оценивалось как по способности сред, кондиционированных двунаправленной смешанной культурой МК человека, преинкубированных с ОС, индуцировать экспрессию DR-молекул на клеточных мембранах, так и по способности сред, кондиционированных митоген-стимулированными спленоцитами мыши, преинкубирован-

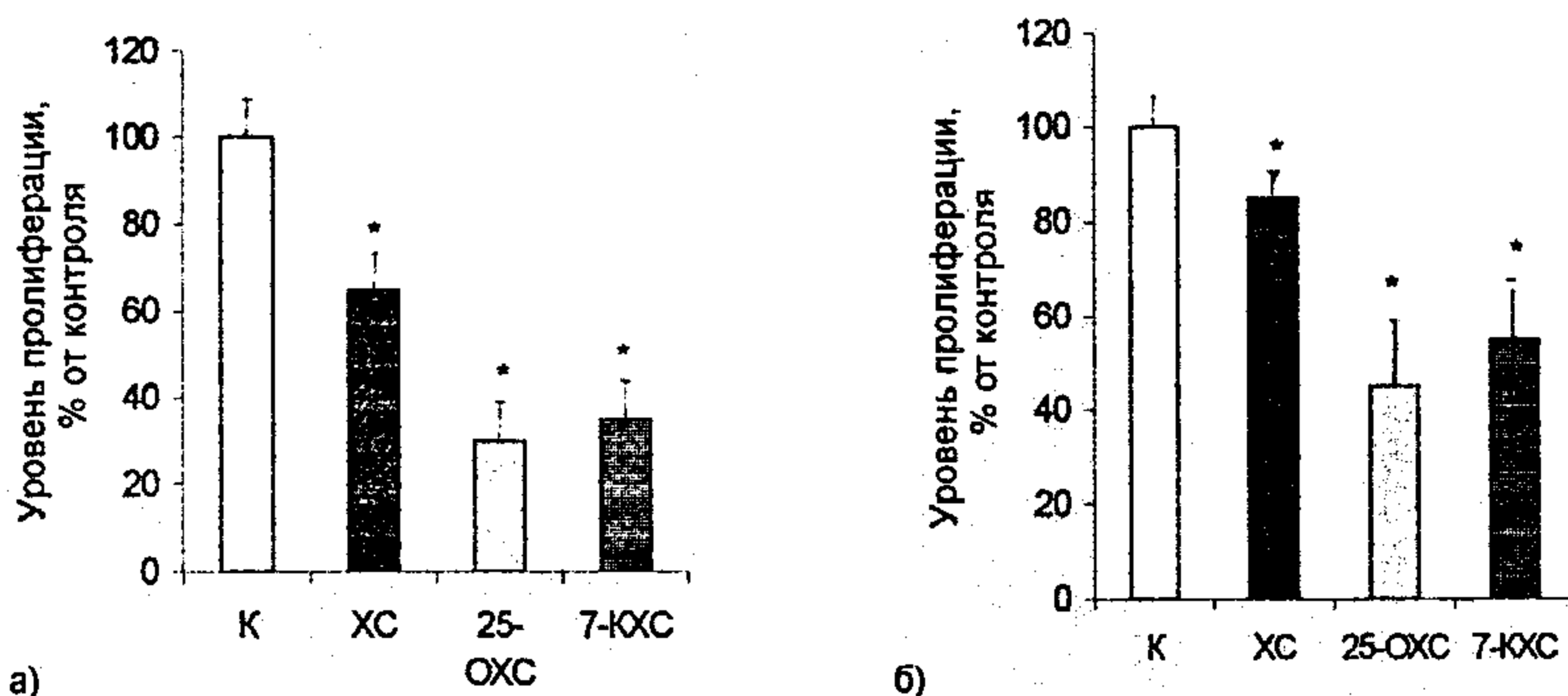


Рис. 4. Влияние оксистеролов на интенсивность пролиферации в однонаправленной смешанной культуре мононуклеаров здоровых доноров: а) обработка отвечающей популяции; б) обработка стимулирующей популяции.

К – контроль, ХС – холестерин, 25-OХС – 25-гидроксихолестерин, 7-KХС – 7-кетохолестерин. *достоверное отличие ($P < 0,05$).

ными с ОС, активировать Мф в тест-системе (по интенсивности дыхательного взрыва). Хорошо известно, что существенную роль в комплексе цитокинов, обладающих макрофаг-активирующей и индуцирующей экспрессию молекул ГКГС класса II активностями, играет ИФН- γ , хотя определенный вклад могут вносить и другие цитокины, обладающие как функциональным синергизмом, так и антагонизмом в отношении рассматриваемых эффектов (Брондз Б.Д. и др., 1987; Ярилин А.А. и др., 1997).

Среды, кондиционированные смешанной культурой МК, преинкубированных с ОС, практически полностью теряют способность индуцировать экспрес-

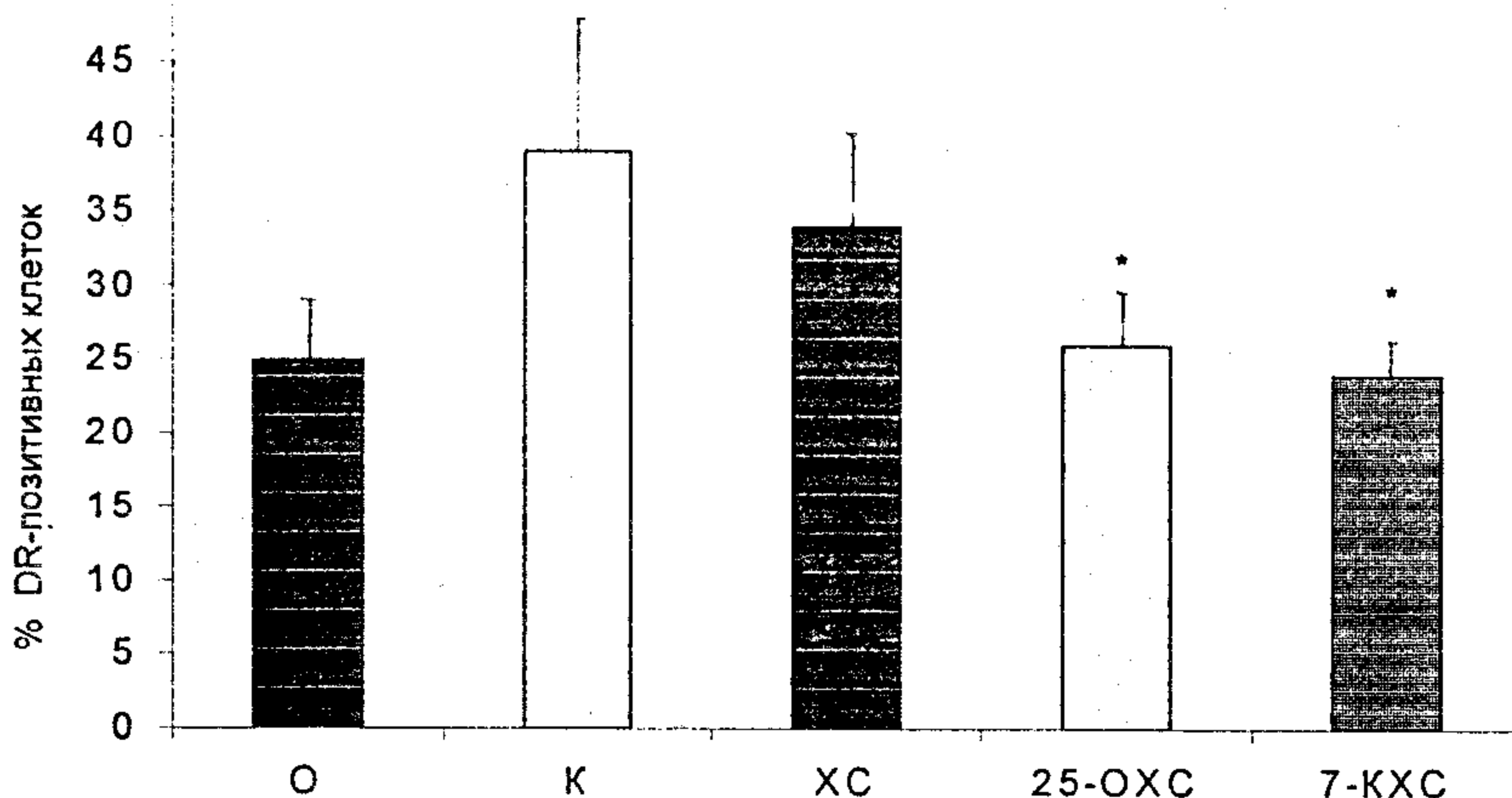


Рис.5. Влияние оксистеролов на способность антиген-стимулированных мононуклеаров здоровых доноров индуцировать экспрессию HLA-DR молекул макрофагами. 0 - отрицательный контроль (без антигенной стимуляции), К - положительный контроль (без оксистеролов), ХС - холестерин, 25-ОХС - 25-гидроксихолестерин, 7-КХС - 7-кетохолестерол.

*достоверное отличие ($P < 0,01$)

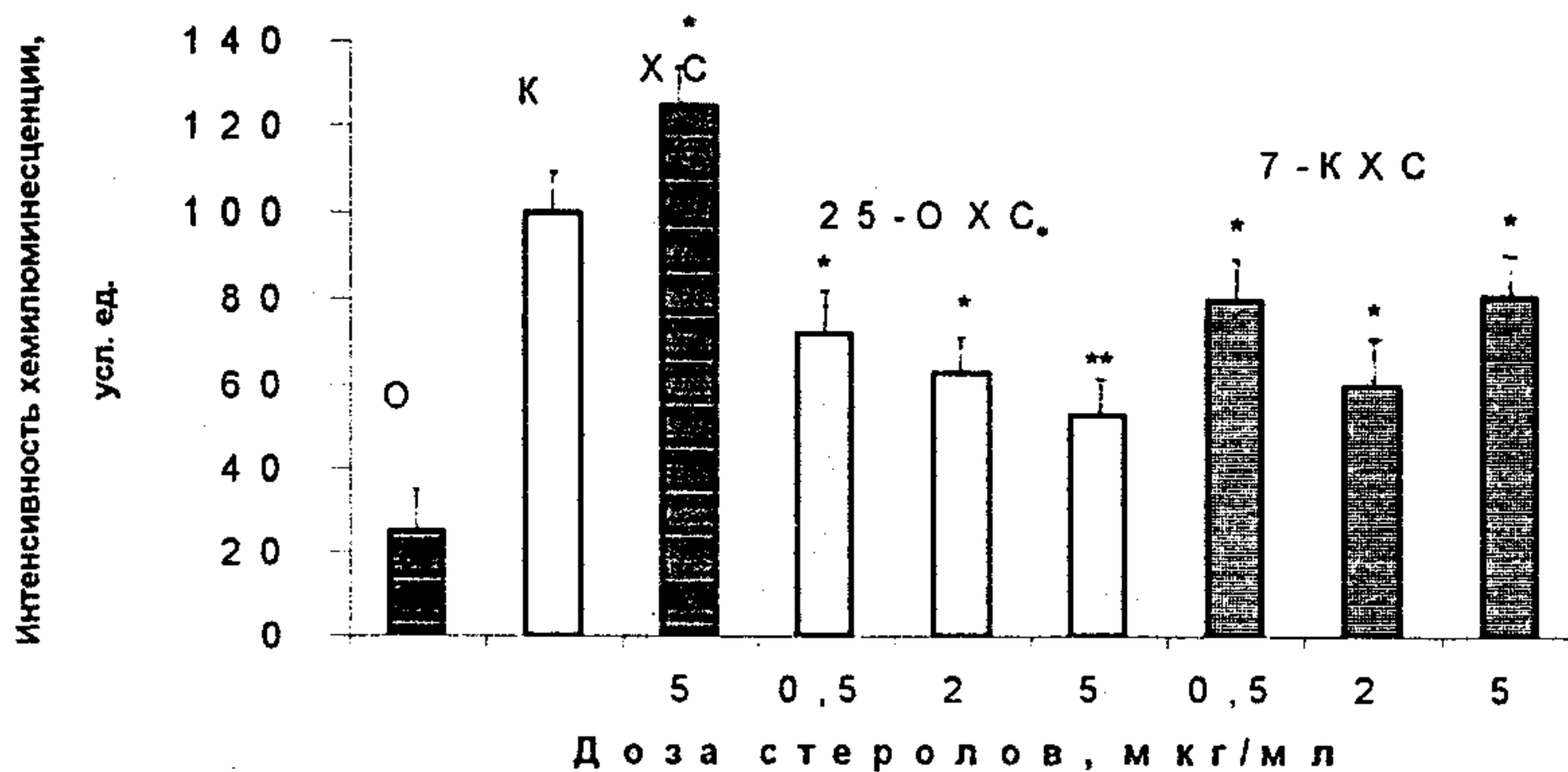


Рис.6. Влияние оксистеролов на макрофаг-активирующую способность Кон А-стимулированных спленоцитов мышей (СВАхС57В1)F₁.

0 - отрицательный контроль (без митогенной стимуляции), К - положительный контроль (без оксистеролов), ХС - холестерин, 25-ОХС - 25-гидроксихолестерин, 7-КХС - 7-кетохолестерин.

* достоверное отличие ($P < 0,05$).

**достоверное отличие ($P < 0,001$).

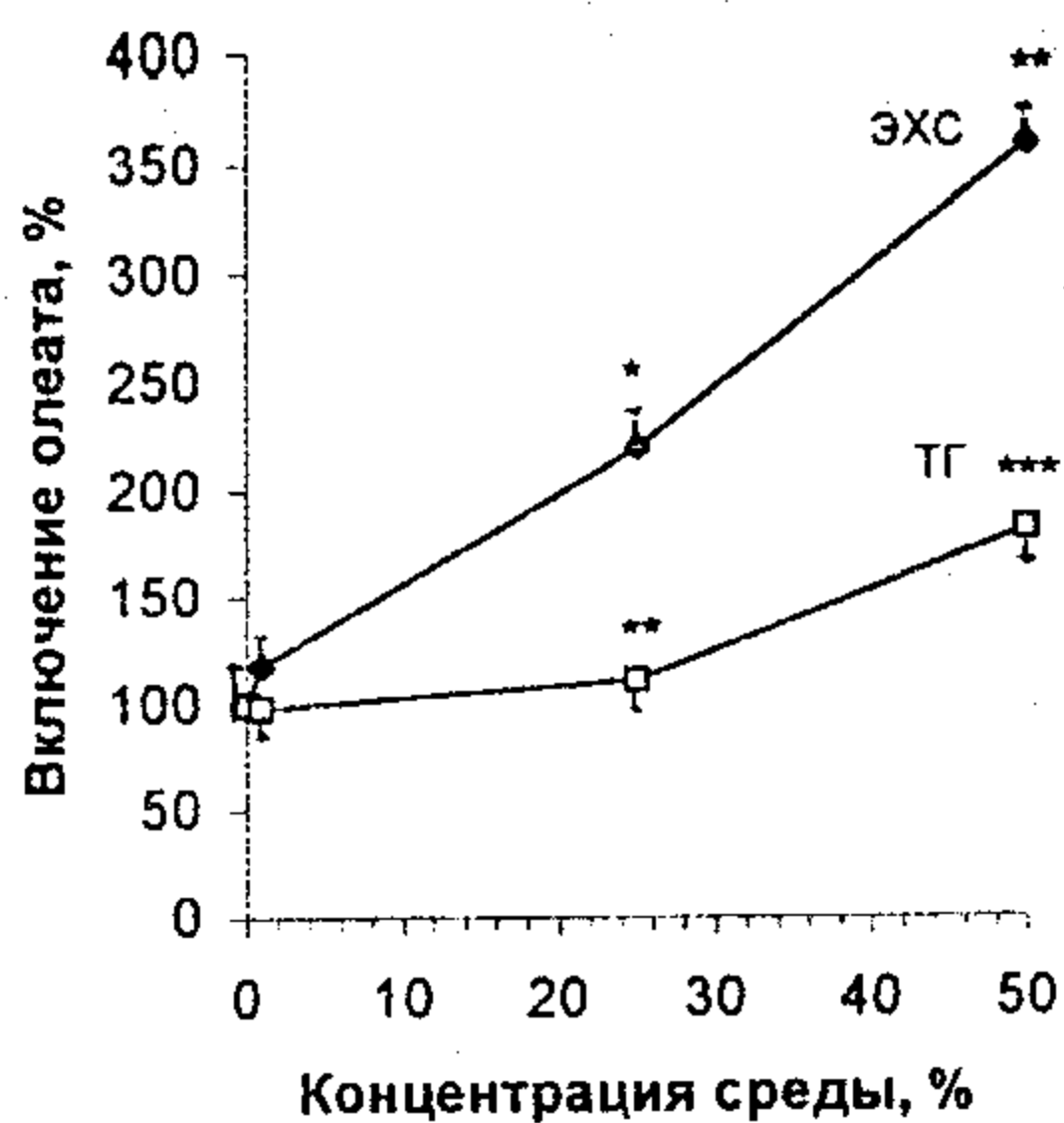
сию молекул ГКГС II класса (рис.5). Весь прирост DR-позитивных клеток исчезал после преинкубации с ОС. При этом ХС не имел подобного эффекта.

Результаты, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что оба исследованных ОС значимо ингибируют способность КонА-стимулированных спленоцитов активировать Мф. ХС таким эффектом не обладал и даже несколько увеличивал активацию Мф.

Таким образом, было показано, что ОС способны модулировать функциональную активность как Мф, так и Лф и регулировать процессы взаимодействия этих двух типов ИКК, а следовательно, быть важным регулирующим фактором в развитии иммунного ответа.

Учитывая тот факт, что ОС могут являться эндогенными продуктами клеточного метаболизма, их синтез и секреция клетками должны быть тесно взаимосвязаны с общим функциональным состоянием клеток. Поэтому в следующей серии опытов мы изучили влияние сред, кондиционированных активированными Мф и Лф, на липидный метаболизм в перитонеальных Мф мыши, изменения которого не могут не отражаться на синтезе ОС. Показателями, характеризующими липидный обмен в Мф, служили скорости включения меченых

субстратов в различные фракции клеточных липидов.



Преинкубация перитонеальных Мф мыши со средами, кондиционированными смешанной культурой спленоцитов мыши, приводит к заметному увеличению скорости включения меченого олеата в ЭХС и ТГ в Мф (рис.7). Похожие результаты были получены при инкубации Мф со средами, кондиционированными Кон А-стимулированными спленоцитами.

Рис.7. Влияние среды, кондиционированной первичной двунаправленной смешанной культурой спленоцитов мышей линий СВА и С57В1, на скорость включения меченого олеата в эфиры холестерина и триглицериды в перитонеальных макрофагах мышей (СВАхС57В1)F₁.

ЭХС-эфиры холестерина. ТГ-триглицериды.

* достоверное отличие ($P < 0,05$);

** достоверное отличие ($P < 0,01$);

*** достоверное отличие ($P < 0,001$).

Среды, кондиционированные ЛПС-активированными Мф, и рекомбинантный ФНО- α также вызывают увеличение скорости включения меченого олеата в ЭХС и ТГ в Мф (рис.8 а,б). Однако, влияние ФНО- α на включение метки в ЭХС и ТГ более выражено по сравнению с влиянием сред, кондиционированных ЛПС-активированными Мф.

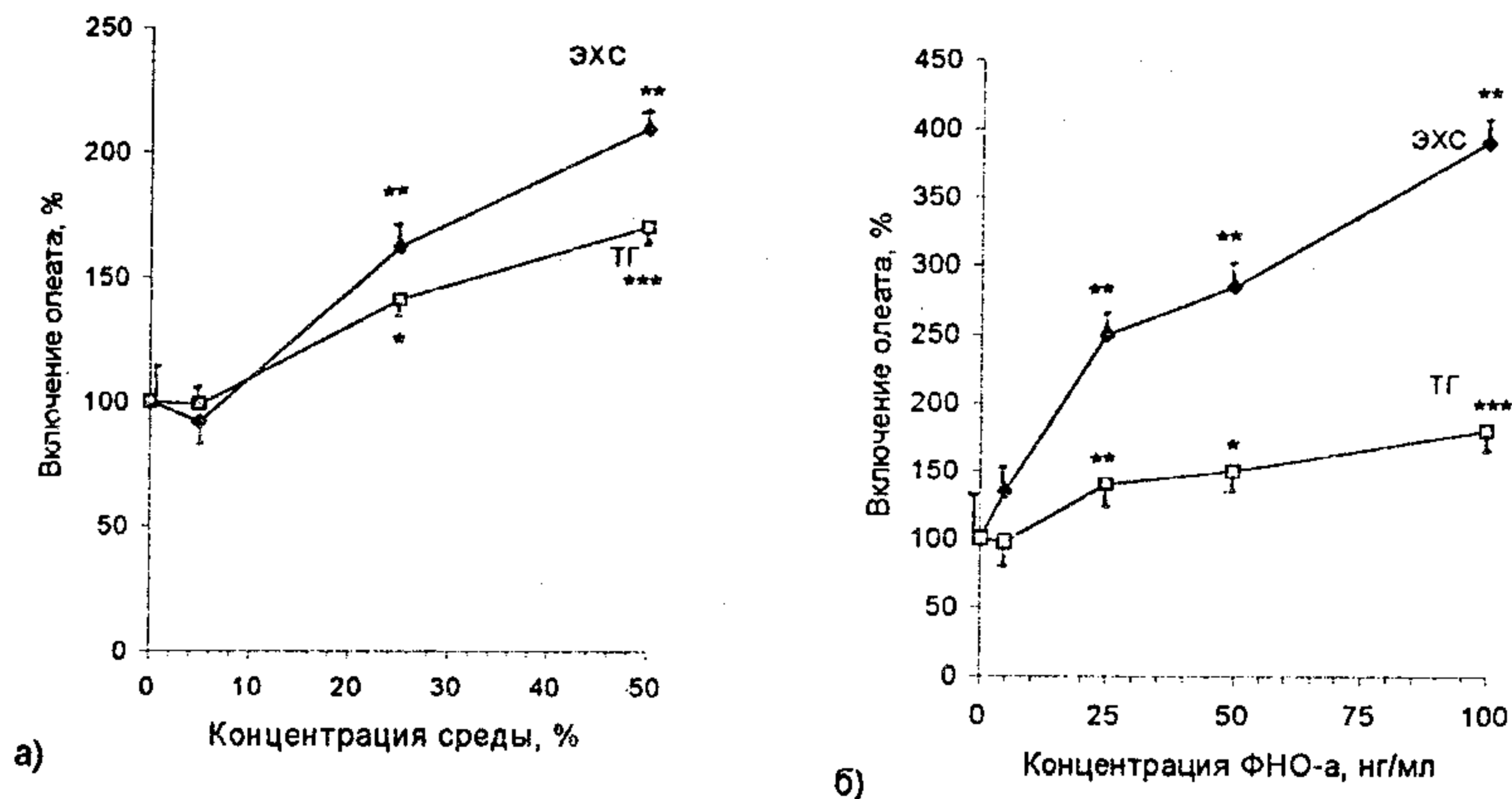


Рис.8. а) Влияние среды, кондиционированной ЛПС-активированными перитонеальными макрофагами мышей (СВАхС57В1) F_1 , на скорость включения меченого олеата в эфиры холестерина и триглицериды в перитонеальных макрофагах мышей (СВАхС57В1) F_1 .

ЭХС-эфиры холестерина, ТГ-триглицериды;

*достоверное отличие ($P < 0.05$);

**достоверное отличие ($P < 0.01$);

***достоверное отличие ($P < 0.001$).

Рис 8 б). Влияние рекомбинантного фактора некроза опухоли- α на скорость включения меченого олеата в эфиры холестерина и триглицериды в перитонеальных макрофагах мышей (СВАхС57В1) F_1 .

ЭХС-эфиры холестерина, ТГ-триглицериды;

*достоверное отличие ($P < 0.05$);

**достоверное отличие ($P < 0.01$);

***достоверное отличие ($P < 0.001$).

Приведенные выше данные по включению олеата в ТГ хорошо согласуются с результатами экспериментов по изучению влияния ФНО- α и сред, кондиционированных активированными Мф и Лф, на скорость включения другого меченого предшественника – глицерина в ТГ в Мф. И среды, кондиционированные активированными Мф и Лф, и ФНО- α увеличивают скорость включения глицерина в ТГ (рис.9).

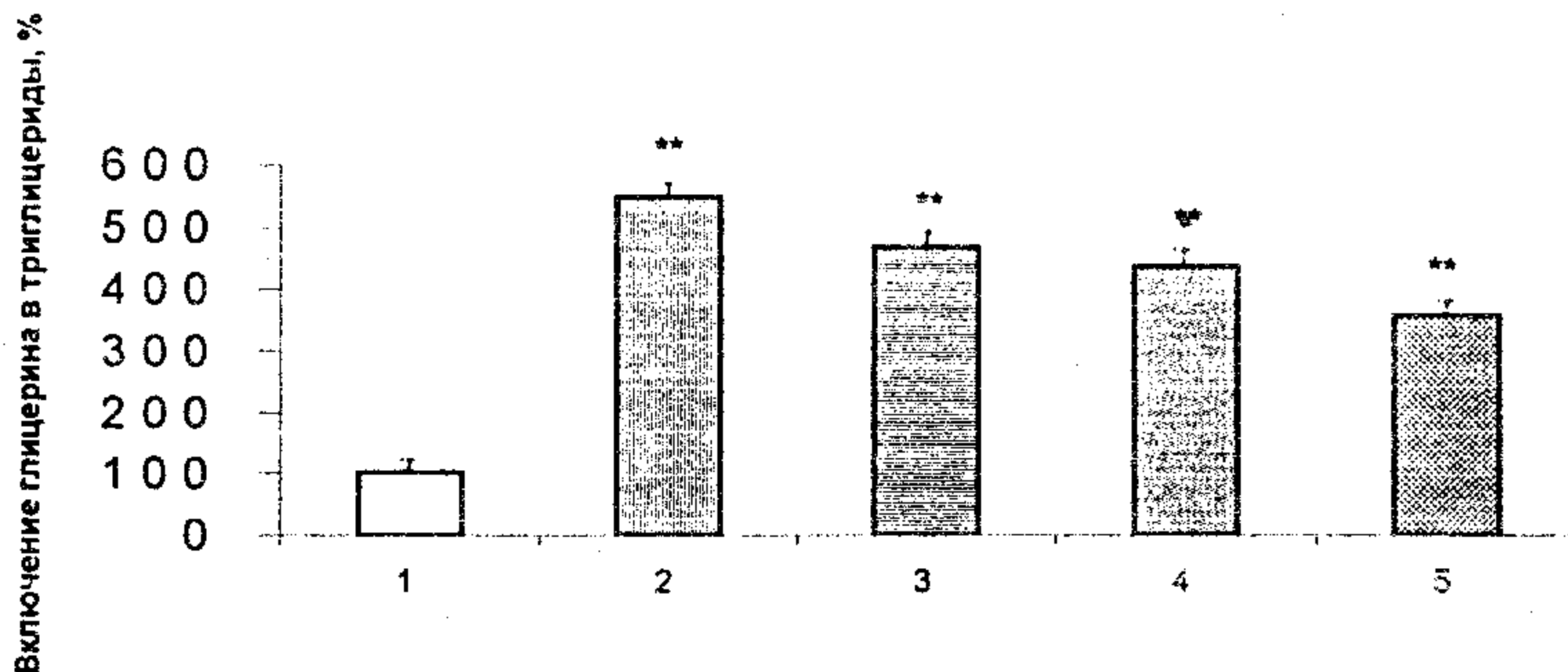


Рис.9. Влияние рекомбинантного фактора некроза опухоли- α и сред, кондиционированных активированными макрофагами и лимфоцитами мыши, на скорость включения глицерина в триглицериды в перитонеальных макрофагах мышей (CBAx57Bl) F_1 .

1-соответствующие контроли; 2-среда, кондиционированная первичной двунаправленной смешанной культурой спленоцитов мышей линий CBA и C57Bl; 3-Среда, кондиционированная Кон А-стимулированными спленоцитами мышей (CBAx57Bl) F_1 ; 4-Среда, кондиционированная ЛПС-активированными макрофагами мышей (CBAx57Bl) F_1 ; 5-рекомбинантный фактор некроза опухоли- α .

**достоверное отличие ($P < 0,01$).

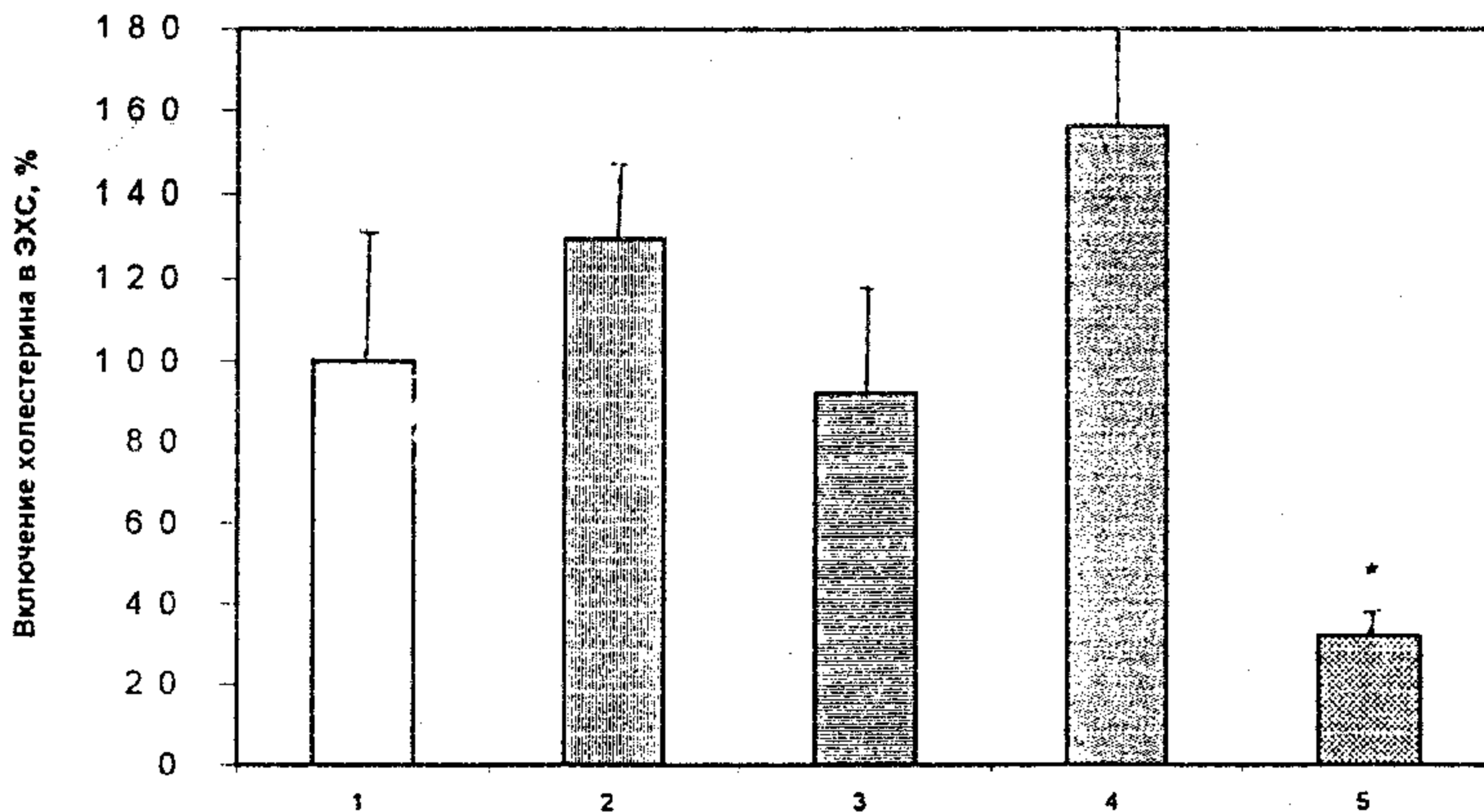


Рис.10. Влияние фактора некроза опухоли- α и сред, кондиционированных активированными макрофагами и спленоцитами мыши, на скорость включения холестерина в эфиры холестерина в перитонеальных макрофагах мышей (CBAx57Bl) F_1 .

1-соответствующие контроли; 2-среда, кондиционированная первичной двунаправленной смешанной культурой спленоцитов мышей линий CBA и C57Bl; 3-Среда, кондиционированная Кон А-стимулированными спленоцитами мышей (CBAx57Bl) F_1 ; 4-Среда, кондиционированная ЛПС-активированными макрофагами мышей (CBAx57Bl) F_1 ; 5-рекомбинантный фактор некроза опухоли- α .

*достоверное отличие ($P < 0,05$).

По аналогии с включением олеата и глицерина в ТГ следовало бы ожидать увеличения скорости включения ХС в ЭХС под влиянием ФНО- α и содержащих цитокины сред. Однако, в отличие от повышения скорости включения олеата в ЭХС под влиянием ФНО- α и сред, кондиционированных активированными Мф и Лф (рис.7,8), мы видим соответствующее уменьшение включения ХС в ЭХС или отсутствие значимых отличий от контроля (рис.10). Это кажущееся противоречие можно объяснить эффектом разбавления метки, т.к. известно, что ФНО- α , ИЛ-1 β и ИФН- γ способны активировать сфингомиелиназу - фермент, расщепляющий липид клеточных мембран сфингомиелин с образованием церамида, что сопровождается выходом ХС из мембран в клетки (Degnan B.M. et al.,1996; Mori K. Et al.,1996; Falk W. et al.,1997; Goldstein J.L. et al.,1997; Hershman J.M. et al.,1997). Возрастание количества свободного ХС в клетке должно параллельно приводить к разведению метки (мы это видим по уменьшению скорости включения меченого ХС в ЭХС), к увеличению синтеза ЭХС (за счет увеличения внутриклеточной концентрации субстрата реакции) и, отсюда, к увеличению скорости включения меченого олеата в ЭХС.

Представленные результаты говорят о принципиальном сходстве эффектов рекомбинантного ФНО- α и сред, кондиционированных активированными Мф и Лф, на исследованные параметры метаболизма липидов в Мф. Различаясь (иногда существенно) по выраженности, эти эффекты совпадают по направленности воздействия на синтез ЭХС и ТГ.

Таким образом, полученные в данной работе результаты, свидетельствуют о том, что ОС - будучи продуктами холестеринавого метаболизма в ИКК - могут использоваться в качестве эндогенных регуляторов активности этих клеток в иммунных реакциях, с другой стороны, факторы, секретируемые ИКК при их функциональной активации, могут быть регуляторами липидного обмена и, следовательно, образования ОС в ИКК.

ВЫВОДЫ

1. Оксистеролы - 25-ОХС и 7-КХС - обладают иммуномодулирующим эффектом и, в условиях *in vitro*, подавляют функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши (интенсивность Fc-зависимого фагоцитоза эрит-

роцитов барана, комитогенную активность, генерацию активированных кислородных метаболитов).

2. Влияние оксистеролов на функциональную активность лимфоцитов человека и мыши, проявляющееся в подавлении иммунного ответа на модели одно- и двунаправленной смешанной культуры мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, не ограничивается прямым антипролиферативным эффектом, а включает в себя супрессию продукции лимфокинов с макрофаг-активирующей и с индуцирующей экспрессию молекул ГКГС II класса активностью.

3. 25-ОХС и 7-КХС, являющиеся представителями двух структурно различных классов оксистеролов, обладают отличиями в их действии на функциональную активность иммунокомпетентных клеток, в частности, 25-ОХС в меньшей степени снижает интенсивность Fc-зависимого фагоцитоза эритроцитов барана и, в отличие от 7-КХС, не подавляет продукцию активированных кислородных метаболитов перитонеальными макрофагами мыши.

4. Рекombинантный ФНО- α и среды, кондиционированные активированными макрофагами, содержащие комплекс цитокинов, при действии *in vitro* на перитонеальные Мф мыши вызывают стимуляцию метаболических превращений холестерина и других липидов в этих клетках, увеличивая скорость включения меченых предшественников в ЭХС и ТГ.

5. Метаболизм холестерина в иммунокомпетентных клетках, находящийся под контролем выделяемых этими клетками цитокинов и определяющий интенсивность образования окисленных производных холестерина с иммуномодулирующими свойствами, является существенным фактором в регуляции функциональной активности макрофагов и лимфоцитов и взаимодействия между ними в процессах иммуногенеза.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Перминова О.М., Любимов Г.Ю., Душкин М.И., Вольский Н.Н. Влияние окисленных производных холестерина на продукцию интерлейкина-1 макрофагами мыши // Тезисы докладов I съезда иммунологов России. - Новосибирск. - 1992. - С. 355.
2. Perminova O.M., Volsky N.N., Dushkin M.I. Effect of cholesterol oxidation derivatives on immunoregulating functions of macrophages and lymphocytes //

Abstracts of 3rd International Congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis. - Munich. - 1993. - P. 157.

3. Perminova O.M., Lubimov G.Yu., Dushkin M.I., Volsky N.N., Kozlov V.A. The cytochrome P-450-dependent cholesterol oxidation in macrophages as a mechanism of immunomodulation by xenobiotics // Abstracts of 12th European Immunology Meeting. - Barcelona. - 1994. - P.58.

4. Перминова О.М. Окисленные производные холестерина как иммунорегуляторы // ИКИ СО РАМН. Научный отчет 1993. - Новосибирск. - 1994. - С.18.

5. Мусатов М.И., Душкин М.И., Вольский Н.Н., Перминова О.М., Коненков В.И., Козлов В.А. Влияние окисленных производных холестерина на лимфокин-стимулированную дифференцировку макрофагов и первичную аллогенную смешанную культуру лимфоцитов человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1997. - Т.124, N.12. - С. 655-657.

6. Перминова О.М. Регуляция цитокинами липидного обмена в макрофагах // ИКИ СО РАМН. Научный отчет 1996. - Новосибирск. - 1997. - С.41.

7. Душкин М.И., Шварц Я.Ш., Вольский Н.Н., Мусатов М.И., Рагино Ю.И., Перминова О.М., Козлов В.А. Иммунодепрессивная активность оксистеролов // Иммунология. - 1998, N.1. - С.22-24.

8. Dushkin M., Schwartz Y., Volsky N., Musatov M., Vereschagin E., Ragino J., Perminova O., Kozlov V. Effects of oxysterols upon macrophage and lymphocyte functions in vitro // Prostaglandins and other lipid mediators. - 1998. - V.55, N.4. - P. 219-236.

9. Perminova O.M., Volsky N.N., Dushkin M.I. Cytokines as regulators of lipid metabolism in macrophages // Abstracts of 10th International congress of immunology. - New Delhi. - 1998. - P.520.

