

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.153.922-008.61-092:612.017.1]-092.9

О. М. Перминова, Н. Н. Вольский, О. Т. Кудаева, Е. В. Гойман, В. А. Козлов

ДИСЛИПИДЕМИЯ И ТН1/ТН2-СООТНОШЕНИЕ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ "ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА"

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14

Показано, что Th2-зависимый вариант развития хронической реакции "трансплантат против хозяина" ассоциирован с возникновением выраженной гиперхолестеринемии, появляющейся одновременно с формированием аутоиммунного иммунокомплексного гломерулонефрита. В то же время развитие этого процесса на фоне гиперлипидемии, индуцированной введением животным полноксамера 407, характеризуется значимым сдвигом в сторону преобладания Th1-зависимого варианта развития болезни. Обсуждается возможность участия в этих процессах изменений уровня оксистеролов в клетках и степени активации ядерных гормональных рецепторов.

Ключевые слова: реакция трансплантат-против-хозяина, Th1-клетки, Th2-клетки, липидный обмен

Perminova O.M., Vol'sky N.N., Kudaeva O.T., Goiman E.V., Kozlov V.A.

DYSLIPIDEMIA AND TH1/TH2 RELATIONSHIP AT DIFFERENT STAGES OF CHRONIC "GRAFT-VERSUS-HOST" REACTION

This study has demonstrated that the Th2-dependent variant of the development of chronic "graft-versus-host" reaction is associated with marked hypercholesterolemia arising parallel to the formation of immunocomplex-mediated autoimmune glomerulonephritis. At the same time, the development of this process in the presence of hyperlipidemia induced by administration of poloxamer p407 is accompanied by a well apparent shift towards the predominance of the Th1-dependent variant of this disease. Possible contribution of variations of intracellular oxysterol levels and activation of hormonal receptors to these processes is discussed.

Key words: "graft-versus-host" reaction, Th1-cells, Th2-cells, lipid metabolism

Одним из важных аспектов влияния гиперлипидемии (в частности, гиперхолестеринемии) на иммунные реакции является вызываемая липидами модуляция соотношения хелперов 1-го (Th1) и 2-го (Th2) типа, величина которого в значительной мере определяет доминирующий вариант иммунного ответа на антигены. Относительно недавно появилось несколько работ, результаты которых дают основания утверждать, что экспериментально вызванная гиперхолестеринемия стимулирует развитие иммунного ответа по Th2-зависимому варианту. Эффект касается как продукции антител к окисленным липопротеидам, так и гуморального иммунного ответа на вводимый в организм подопытных животных ксеногенный белок [12, 18, 22]. Теоретически такой результат гиперхолестеринемии может быть объяснен вовлечением в процесс LXR (liver X receptors) — факторов транскрипции, активируемых окисленными производными холестерина и способных сдвигать баланс хелперов в сторону Th2 [1, 9, 19]. В то же время многочисленные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в развитии атеросклероза заболевания, тесно ассоциированного со стойкой гиперхолестеринемией, основную патогенетическую роль играют Th1-зависимые иммунные реакции [10, 14]. Кроме того, имеется ряд экспериментальных работ, показывающих, что далеко не во всех ситуациях гиперхолестеринемия сочетается с доминированием Th2-зависимых иммунных реакций [6].

Целью данной работы стало изучение взаимосвязи между уровнем холестерина в крови и Th1/Th2-соотношением в организме в новой, еще не исследованной экспериментальной ситуации. Поскольку в ранее описанной нами модели хронической реакции "трансплантат против хозяина" (хРТПХ) исход патологического процесса тесно связан с Th1/Th2-соотношением на ранней стадии развития хРТПХ [2, 3], было высказано предположение о том, что гиперхолестеринемия может быть ассоциирована с развитием одного из вариантов заболевания.

Материалы и методы. В работе использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов (C57Bl/6 x DBA/2)_{F1} в возрасте 2 мес, полученных из питомника СО РАМН и содержащихся в стандартных условиях вивария.

У мышей-гибридов (C57Bl/6 x DBA/2)_{F1} хРТПХ индуцировали двукратным (с интервалом 6 дней) переносом спленоцитов мышей линии DBA/2 в суммарной дозе $130 \cdot 10^6$ клеток [3]. Критерием развития заболевания по Th2-зависимому (или, соответственно, Th1-зависимому) варианту служило развитие (или отсутствие) у экспериментальных животных люпус-подобного аутоиммунного гломерулонефрита, характеризующегося стойкой протеинурией (концентрация белка в моче не менее 3 мг/мл в трех последовательных измерениях). Как было установлено ранее [3], возникновение клинически выраженного поражения

почек сочетается с преобладанием активности Th2-лимфоцитов. За момент начала индукции хРТПХ принимали дату первой трансплантации лимфоидных клеток.

Гиперлипидемию индуцировали многократным введением полксамера 407 (P407) по методу [11]. Препарат (Pluronic F-127, "Sigma", США) вводили внутрибрюшинно в дозе 7,5 мг/мышь через день в течение 2 нед. Животным контрольной группы в те же сроки вводили растворитель (0,5 мл среды RPMI 1640). Выраженность гиперлипидемии оценивали по уровню холестерина в сыворотке крови, который определяли фотометрически по методу с холестериноксидазой, используя наборы Biosub CHOL ("Bioson Diagnostik", Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Достоверность различий между выборочными долями вариант оценивали с помощью углового преобразования Фишера.

Результаты и обсуждение. При исследовании содержания липидов крови у животных с уже сформировавшимися исходами развития РТПХ установили (рис. 1), что Th2-зависимый вариант течения РТПХ характеризуется выраженной гиперхолестеринемией, в то время как мыши с развитием Th1-зависимого варианта имели нормальный уровень холестерина в крови. Повышение этого показателя у мышей с аутоиммунным гломерулонефритом было наиболее выражено в период, соответствующий формированию поражения почек и появлению протеинурии (около 3 мес после индукции хРТПХ), однако и через 5 мес, и даже через 12 мес уровень холестерина в крови указанных животных оставался достоверно повышенным. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными, говорящими о сдвиге баланса хелперов при экспериментальной гиперхолестеринемии в сторону Th2 [12, 18, 22], и позволил предположить, что и в использованной нами модели повы-

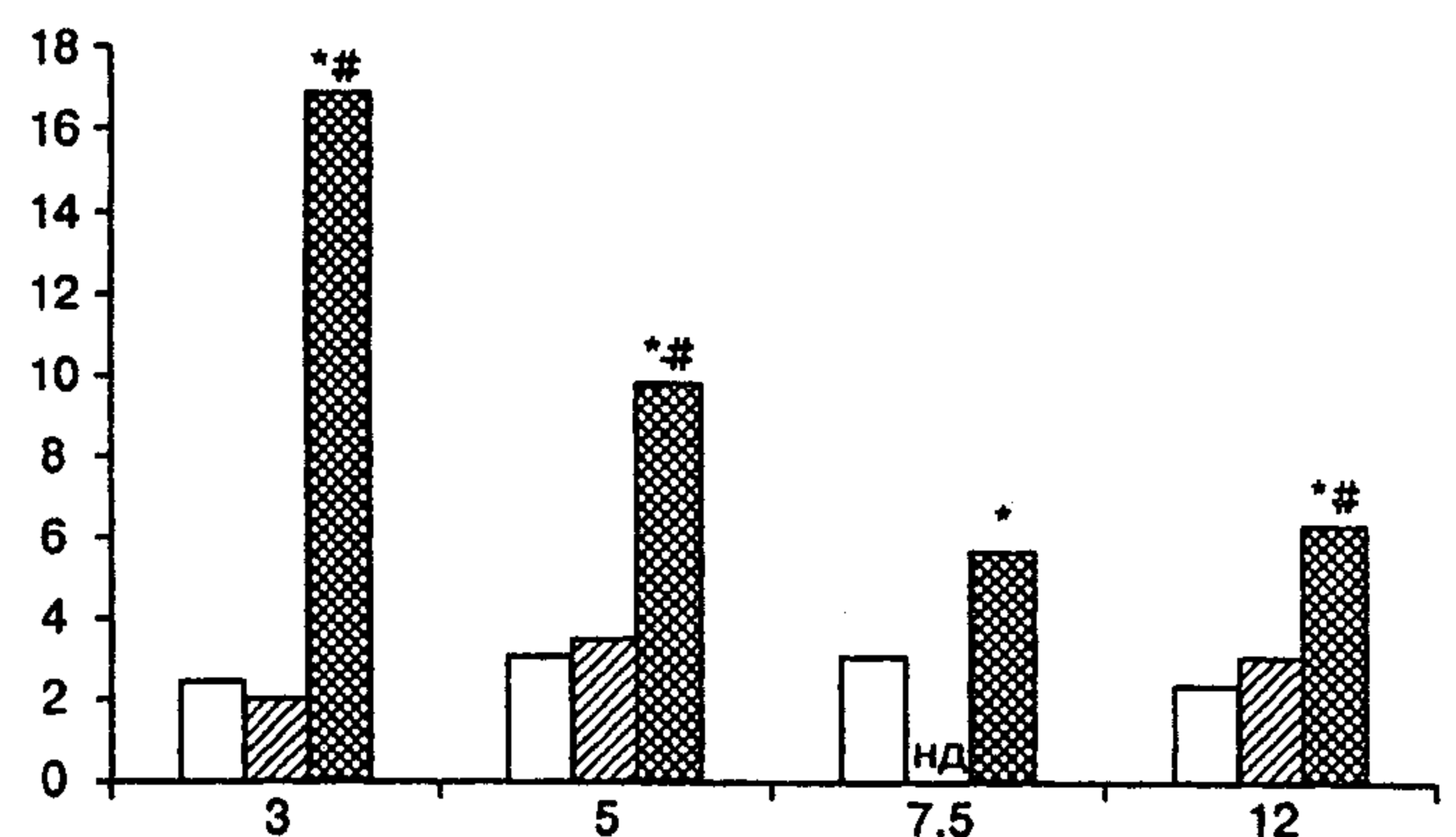


Рис. 1. Концентрация холестерина в сыворотке крови у мышей в различные сроки после индукции хРТПХ.

По оси абсцисс — срок после индукции хРТПХ (в мес); по оси ординат — уровень холестерина в сыворотке крови у мышей (в мг/мл). Белые столбики — контроль (без хРТПХ), серые — Th1-зависимый вариант хРТПХ, черные — Th2-зависимый вариант хРТПХ. * и — достоверные отличия ($p < 0,05$) от контроля и групп с Th1-зависимым вариантом хРТПХ соответственно; nd — данные отсутствуют.

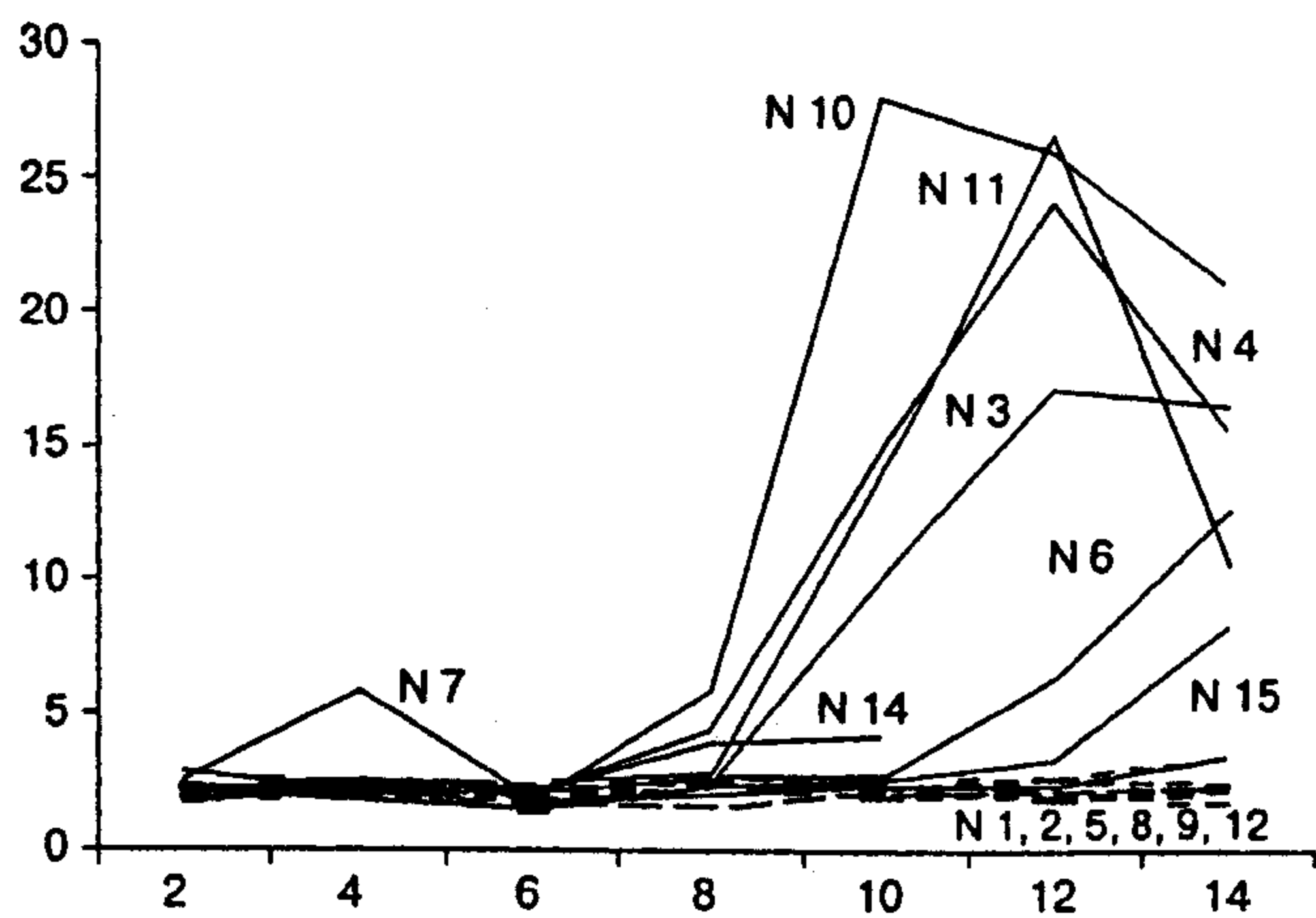


Рис. 2. Появление гиперхолестеринемии у отдельных животных в динамике развития хРТПХ.

По оси абсцисс — срок после индукции хРТПХ (в нед); по оси ординат — уровень холестерина в сыворотке крови у мышей (в мМ). Сплошной линией показаны изменения уровня холестерина в сыворотке у мышей с Th2-зависимым вариантом заболевания, пунктиром — с Th1-зависимым вариантом. Номера животных соответствуют таковым в таблице.

шение уровня холестерина, вызванное различными причинами у части подопытных животных, может способствовать сдвигу Th1/Th2-соотношения и, таким образом, предрасполагать их к развитию Th2-зависимого варианта хРТПХ.

Однако результаты исследования уровня холестерина крови в динамике развития хРТПХ не подтвердили это предположение. Обнаружено (рис. 2, см. таблицу), что выраженная гиперхолестеринемия у мышей с Th2-зависимым вариантом хРТПХ не предшествует формированию аутоиммунного гломерулонефрита, а возникает лишь параллельно с ним (в одни и те же сроки от начала индукции хРТПХ). Видно, что индивидуумы, у которых иммунопатологический процесс развивается по различным клиническим вариантам, на начальных этапах индукции РТПХ существенно не отличаются друг от друга по сывороточному уровню холестерина, и лишь через 8—12 нед этот показатель начинает возрастать у животных с Th2-зависимым вариантом развития хРТПХ. По времени это совпадает с формированием у них нефрита и его клинической манифестацией — появлением стойкой протеинурии (см. таблицу).

Основываясь на этих данных можно сказать, что гиперхолестеринемия, обнаруженную нами у мышей с Th2-зависимым вариантом развития хРТПХ, не следует рассматривать как патогенетический фактор, способствующий сдвигу Th1/Th2-соотношения в организме, так как она появляется лишь после того, как выбор в пользу преобладания гуморальных иммунных реакций был уже сделан, и, следовательно, Th1/Th2-переключение уже произошло. По-видимому, наблюдаемая в нашей модели гиперхолестеринемия обусловлена развивающимся у этих животных аутоиммунным заболеванием. Хотя патогенетические механизмы данного явления еще недостаточно ясны, сам факт сочетания различных форм нефритов и нефротического синдрома с гиперхолестеринемией хорошо извест-

тен в клинике и описан при различных формах экспериментальных нефритов у животных [8, 13, 20].

В качестве гипотетического патофизиологического механизма, связывающего эти, на первый взгляд, столь разнородные клинические показатели, можно предположить ингибирование активности стерол-27-гидроксилазы иммунными комплексами, образующимися в больших количествах при различных аутоиммунных патологиях. Стерол-27-гидроксилаза — митохондриальный цитохром P-450-зависимый фермент, катализирующий окисление боковой цепи холестерина и, тем самым, способствующий его дальнейшему превращению в желчные кислоты. Кроме того, продукт 27-гидроксилазной реакции — 27-гидроксихолестерин — является одним из физиологических лигандов LXR и посредством их активации ингибирует ключевую реакцию, которая определяет скорость синтеза холестерина в организме. Ингибирование этого фермента в тканях должно приводить к уменьшению катаболизма холестерина и одновременно к стимуляции его синтеза *de novo*, а следовательно, и к появлению гиперхолестеринемии. Несколько лет назад было обнаружено, что активность стерол-27-гидроксилазы в макрофагах может быть резко снижена при культивировании этих клеток в присутствии иммунных комплексов [17]. Поскольку появление аутоантител (и, следовательно, повышенное образование таких комплексов) представляет собой необходимое патогенетическое звено в развитии аутоиммунных гломерулонефритов у человека и наблюдается при разнообразных экспериментальных поражениях почек [8, 13, 20], в том числе и при использованной нами модели хРТПХ [2, 4, 16], возникающую при этих состояниях гиперхолестеринемия можно объяснить влиянием иммунных комплексов на фермент, который играет важную роль в регуляции метаболических путей, определяющих баланс холестерина в организме. Анало-

Сроки появления гиперхолестеринемии и протеинурии у мышей после индукции РТПХ

№ животных	Срок после индукции хРТПХ, нед						
	2	4	6	8	10	12	14
	Хс Б	Хс Б	Хс Б	Хс Б	Хс Б	Хс Б	Хс Б
1	--	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--	--
3*	--	--	--	--	+ нд	++	++
4*	--	--	--	++	++	++	++
5	--	--	--	--	--	--	--
6*	--	--	--	--	- нд	++	++
7	--	+ -	--	- +	- нд	--	- +
8	--	--	--	--	--	--	--
9	--	--	--	--	--	--	+
10*	--	--	--	++	++	++	++
11*	--	--	--	- +	++	++	++
12	--	--	--	--	--	--	--
13	нд -	--	--	--	--	--	--
14*	--	--	--	++	++	+	
15*	--	--	--	--	--	--	++

Примечание. * — животные с развитием хРТПХ по Th2-зависимому варианту; Хс — холестерин; Б — белок; +/- — для холестерина: Хс > 3,5 мМ/Хс < 3,5 мМ, для белка: Б > 3 мг/мл/Б < 3 мг/мл; нд — данные отсутствуют; + — гибель животного.

гичным образом можно трактовать и обнаруженную в клинике ассоциацию между развитием некоторых аутоиммунных процессов и нарушениями холестерина обмена (например, гиперхолестеринемию у больных системной красной волчанкой [15]).

Гиперхолестеринемия у мышей с Th2-зависимым вариантом хРТПХ развивается на относительно поздних стадиях патологического процесса и не может рассматриваться как патогенетический фактор, определяющий направление развития иммунопатологических реакций, потому влияние гиперлипидемии на Th1/Th2-поляризацию при хРТПХ изучали на фоне изменений липидного метаболизма, вызванных экзогенным фактором. В качестве фармакологического воздействия, приводящего к развитию у животных выраженной гиперлипидемии, использовали внутрибрюшинное введение полуксамера 407 (P407) (Pluronic F-127). Влияние этого широко используемого в косметике и фармацевтике препарата на липидный обмен у мышей всесторонне исследовано, и его введение было предложено как простой, экономичный и удобный экспериментальный метод для моделирования гиперхолестеринемии и изучения атерогенеза артерий [11]. В предварительных опытах нами установлено, что введение P407 мышам в дозе 7,5 мг через день вызывает стойкое повышение уровня холестерина в крови в среднем до 12–15 мМ (предел суточных колебаний от 7 до 22 мМ), что в несколько раз превышает величину этого показателя у интактных мышей (2,75 мМ). Препарат вводили мышам-реципиентам в течение 2 нед, после чего индуцировали хРТПХ. Полученные результаты (в контроле Th2 – 48, 9%, после введения препарата — Th2 — 25%, $p < 0,05$) ясно показывают, что экспериментальная гиперлипидемия вызывает сдвиг соотношения в сторону, противоположную ожидаемой: на ее фоне существенно возрастает относительное количество животных, у которых развивается Th1-зависимый вариант хРТПХ.

Расхождение между полученным нами эффектом и ранее опубликованными данными других исследователей [12, 18, 22] может быть обусловлено различными факторами; наиболее вероятные из них нами представлены ниже.

1. Существенное различие в уровне гиперхолестеринемии. В наших опытах использовалась доза препарата, приводящая к "умеренной" гиперхолестеринемии, по оценке X. Zhou и соавт. [22] (в их работе такой оценке соответствовал уровень холестерина 13 мМ). Но в этих условиях преобладание Th1-влияния на иммунный ответ было выявлено и в работах [18, 22]: их авторы обнаружили доминирование антител подкласса IgG2a (Th1-зависимых) в сыворотке крови у мышей с умеренной гиперхолестеринемией и наличие у них интерферона- γ в атероматозных участках стенки аорты. И лишь при "выраженной" гиперхолестеринемии (содержание холестерина крови 58–77 мМ) они отметили сдвиг в сторону образования IgG1 и IgE (Th2-зависимые классы антител) и появление интерлейкина-4 в артериальной стенке. В работе T. Johnston и X. Zhou [12], где в качестве гиперлипидемического агента также был использован P407, его доза была значительно больше, чем та, что взята нами, и приводила

к развитию выраженной гиперхолестеринемии (уровень холестерина крови до 40 мМ).

Результаты исследования других авторов [6] также показали, что умеренная гиперхолестеринемия не приводит к сдвигу в сторону Th2-зависимого иммунного ответа на экзогенный белок, поскольку внутримышечная вакцинация антигеном HSP65 мышей с экспериментально вызванным атеросклерозом вызывает образование антител подкласса IgG2a и продукцию цитокинов Th1-профиля — так же, как и у контрольных животных с нормальным уровнем холестерина крови.

2. Различие в длительности воздействия гиперлипидемии на иммунную систему. Как в экспериментах с животными, содержащимися на атерогенной диете [18, 22], так и в работе с введением P407 [12] показатели Th1/Th2-переключения были исследованы лишь через 3–4 мес после индукции гиперлипидемии и, следовательно, после того, как иммунная система животных подвергалась в течение этого срока воздействию гиперхолестеринемии. В наших же опытах непосредственное фармакологическое воздействие на уровень липидов крови укладывалось в срок 2 нед, и этого было достаточно, для того, чтобы вызвать существенную Th1/Th2-девиацию иммунных реакций.

Основываясь на этих отличиях и принимая во внимание то, что в экспериментах зарубежных исследователей наблюдаемый ими сдвиг в сторону Th2-зависимых иммунных реакций совпадает по срокам с появлением в крови животных большого количества окисленных липопротеинов [11, 12], можно предположить, что в этих условиях преобладание активности Th2-лимфоцитов обусловлено повышением уровня оксистеролов — окисленных производных холестерина, входящих в состав окисленных липопротеинов низкой плотности. Будучи естественными лигандами LXR, оксистеролы должны вызывать подавление Th1-зависимых реакций и стимулировать оппозитные формы иммунного ответа.

В наших экспериментах механизм, опосредующий Th1/Th2-переключение, может быть прямо противоположным. В связи с краткосрочностью воздействия и отсутствием выраженной гиперхолестеринемии в этом случае нет условий для повышенного образования оксистеролов. Напротив, одним из эффектов P407 *in vivo* могут быть секвестрация поглощаемых клетками липопротеинов в эндолізосомах (как это было показано для других ранее изученных детергентов, в частности для Тритона WR 1339 [7]) и соответствующее снижение концентрации свободного холестерина в клетках. Следствием этого должно стать уменьшение скорости эндогенного образования оксистеролов и отсюда — снижение количества их активных комплексов с LXR. Косвенным подтверждением именно такого сценария событий при введении животным P407 может служить тот факт, что одним из первичных эффектов этого вещества на липидный метаболизм, который обнаружен T. Johnston и соавт. [11] и приводит в итоге к возникновению гиперхолестеринемии, оказывается подавление активности холестерин-7 α -гидроксилазы — фермента, инициирующего каскад реакций, в ходе которых холестерин метаболизируется до желчных ки-

слот. Как известно [21], ген холестерина-7 α -гидроксилазы имеет в промоторной области участок, специфически связывающий активированные LXR, и скорость транскрипции этого белка прямо определяется активностью данных ядерных рецепторов. Следовательно, как снижение скорости 7 α -гидроксилазной реакции, вызванное введением P407, так и выявленный нами сдвиг в сторону Th1-зависимых реакций под воздействием этого препарата могут объясняться снижением уровня оксистеролов в клетках и соответствующим уменьшением степени активации LXR.

Таким образом, внешне противоречащие друг другу результаты наших экспериментов и данные, полученные в цитированных выше работах [12, 18, 22], могут быть однотипно истолкованы эффектами разнонаправленных воздействий на окислительный метаболизм холестерина и вытекающими отсюда изменениями уровня оксистеролов в организме, приводящими к ингибированию исходной активности (или, напротив, к их дополнительной активации) ядерных рецепторов, которые имеют иммунорегуляторные функции [5, 9, 19]. Наблюдаемая при этом взаимосвязь между гиперхолестеринемией и направлением Th1/Th2-девиации не всегда может быть объяснена прямыми причинно-следственными отношениями между этими параметрами и во многих случаях ее следует рассматривать как ассоциацию дизрегуляторных процессов в иммунной системе с широко понимаемой дислипидемией, т. е. как синдром, оба компонента которого обусловлены изменениями активности внутриядерных рецепторов (LXR, PPAR и т. п.) Естественно предположить, что такие взаимосвязи могут возникать не только при искусственно созданных экспериментальных ситуациях, но и быть существенной частью патогенеза некоторых распространенных заболеваний. В частности, давно обнаруженное сочетание гиперхолестеринемии с развитием атеросклероза, традиционно рассматриваемое как прямое следствие отложения холестерина в стенках артерий при его повышенном содержании в крови, может иметь и альтернативное объяснение. Его можно рассматривать как результат первичного снижения активности ферментов, участвующих в окислительном метаболизме холестерина, что приводит через снижение количества окси-

стеролов и подавление активности LXR, с одной стороны, к появлению гиперхолестеринемии, а с другой — к преобладанию провоспалительных (Th1-зависимых) иммунных реакций, характерных для развития атеросклеротических бляшек в стенках артерий. Проверка данной гипотезы должна стать содержанием дальнейших исследований в этой области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М. И., Кудинова Е. Н., Шварц Я. Ш. // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 2. — С. 18–25.
2. Козлов В. А., Кудалева О. Т., Колесникова О. П. и др. // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 3. — С. 143–146.
3. Кудалева О. Т., Гойман Е. В., Лыков А. П. и др. // Бюл. экпер. биол. — 2005. — № 9. — С. 325–327.
4. Ткачев В. О., Ненашева Е. Н., Кудалева О. Т. и др. // Иммунология. — 2006. — № 2. — С. 98–101.
5. Duskhin M., Schwartz Y., Volsky N. et al. // Prostaglandins Other Lipid Mediat. — 1998. — Vol. 55, N 4. — P. 219–236.
6. Fonseca D. M., Bonato V. L. D., Silva C. L. et al. // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2007. — Vol. 40, N 11. — P. 1495–1504.
7. Goldstein J. L., Brunstedde G. Y., Brown M. S. // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250, N 19. — P. 7854–7862.
8. Haggqvist B., Hultman P. // Clin. Exp. Immunol. — 2003. — Vol. 134, N 2. — P. 202–209.
9. Jamroz-Wisniewska A., Wyjicka G., Horoszewicz K. et al. // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2007. — Vol. 61. — P. 760–785.
10. Jawien J. // Pol. Arch. Med. Wewnet. — 2008. — Vol. 118, N 3. — P. 127–130.
11. Johnston T. P. // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2004. — Vol. 43, N 4. — P. 595–606.
12. Johnston T. P., Zhou X. // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2007. — Vol. 49, N 4. — P. 246–252.
13. Kaneko Y., Nimmerjahn F., Madaio M. P. et al. // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203, N 3. — P. 789–797.
14. Laurat E., Poirier B., Tupin E. et al. // Circulation. — 2001. — Vol. 104, N 2. — P. 197–202.
15. McMahon M., Hahn B. H. // Curr. Opin. Immunol. — 2007. — Vol. 19, N 6. — P. 633–639.
16. Ogawa S., Nitta K., Hara Y. et al. // Kidney Int. — 2000. — Vol. 58, N 5. — P. 2215–2220.
17. Reiss A. B., Awadallah N. W., Malhotra S. et al. // J. Lipid Res. — 2001. — Vol. 42, N 11. — P. 1913–1922.
18. Robertson A.-K. L., Zhou X., Strandvik B. et al. // Scand. J. Immunol. — 2004. — Vol. 59, N 3. — P. 285–293.
19. Walcher D., Kummel A., Kehrle B. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2006. — Vol. 26, N 5. — P. 1022–1028.
20. Wu C. C., Chen J. S., Lin S. H. et al. // Lab. Invest. — 2008. — Vol. 42, N 3. — P. 350–359.
21. Wyjicka G., Jamroz-Wisniewska A., Horoszewicz K. et al. // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2007. — Vol. 61. — P. 736–759.
22. Zhou X., Paulsson G., Stemme S. et al. // J. Clin. Invest. — 1998. — Vol. 101, N 8. — P. 1717–1725.

Поступила 14.07.09