

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНИТЕТА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 612.017.1.064:547.924].08

М. И. Душкин, Я. Ш. Шварц, Н. Н. Вольский,
М. И. Мусатов, Ю. И. Рагино, О. М. Перминова,
В. А. Козлов

ИММУНОДЕПРЕССИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИ- СТЕРОЛОВ

Институт терапии и Институт клинической иммунологии СО
РАМН, Новосибирск

Окисленные производные холестерина (оксистеролы — ОС), выделенные в отдельный класс биологически активных соединений, модулируют многие функции клеток, в частности эффективно воздействуют на иммунную систему [14]. В последние годы интерес к иммуномодулирующей функции этих соединений возник в связи с появлением данных о накоплении ОС в различных тканях при воспалении [15], окислительном стрессе [6] и атеросклерозе [4].

В исследованиях на клеточных культурах показано, что многие ОС в низких концентрациях могут модулировать ранние стадии активации Т-клеток. Так, 25-гидроксихолестерин (25-ОН-Хс) супрессировал митоген- и аллоантигензависимую пролиферацию и ингибировал трансформацию нативных лимфоцитов в цитотоксические [10, 14]; 7-кетохолестерин (7-кето-Хс) ингибировал активность киллерных клеток и бластогенез лимфоцитов [7]. Влияние ОС на иммунные функции макрофагов и на лимфоцит-макрофагальные взаимодействия изучено мало. В литературе имеются лишь данные о том, что внутрибрюшинное введение 25,7-дигидроксихолестерина снижало экспрессию антигенов гистосовместимости класса II перитонеальными макрофагами мыши (ПМ) [11].

Настоящая работа посвящена изучению влияния 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс на генерацию активных форм кислорода, экспрессию Fc-рецепторов и фагоцитоз эритроцитов барана (ЭБ), секрецию интерлейкина-1 (ИЛ-1) в культуре ПМ мыши, секрецию макрофагактивирующего фактора (МАФ) спленоцитами мыши, пролиферативную активность

и секрецию Ia-индуцирующего фактора (Ia-ИФ) в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ).

Методика исследований. Работа проведена на мышах-самцах (C57Bl/6×CBA)F₁. ПМ элиситировали 4% крахмалом, выделяли на 4-е сутки с использованием среды Дульбекко без кальция и магния и культивировали в 35-миллиметровых чашках Петри ($2 \cdot 10^6$ клеток на чашку) в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина (среда А), как подробно описано нами ранее [5]. Суспензии тимоцитов и спленоцитов получали из тимуса и селезенки мышей фильтрацией через нейлоновую мембрану в среде RPMI 1640, содержащей 10 мМ HEPES и 0,5 мкМ 2-меркаптоэтанол [1]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 мМ глутамин и 1 мМ пивратата натрия (среда Б). 25-ОН-Хс, 7-кето-Хс и холестерин (Хс) добавляли в клеточную среду в растворе этанола из расчета 5 мкл на 1 мл среды. Жизнеспособность клеток оценивали, используя тест с трипановым синим. В наших экспериментах 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс в использованных концентрациях не оказывали влияния на клеточную жизнеспособность.

Генерацию активных кислородных метаболитов (АКМ) в макрофагах оценивали, используя клеточный монослой, культивируемый в 2 мл среды Хенкса в присутствии опсонизированного зимозана (1 мг/мл) в 35-миллиметровых пластиковых чашках, методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в двухканальном хемилюминометре "Фотон" [5].

Для определения активности ИЛ-1 монослой ПМ культивировали в среде А в присутствии 25-ОН-Хс, 7-кето-Хс и Хс в течение 24 ч. Затем клетки отмывали средой Хенкса и инкубировали в среде А в течение 24 ч в присутствии 25 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) *E. coli*. Активность ИЛ-1 определяли в культуре тимоцитов по инкорпорации ³H-тимидина в клетки [12].

Интенсивность Fc-зависимого связывания и фагоцитоза ЭБ определяли методом [13] с небольшими модификациями. Монослой макрофагов культивировали 24 ч в среде А в присутствии ОС. Затем клетки отмывали средой Хенкса и к монослою добавляли 1% суспензию опсонизированных ЭБ в среде А. Клетки инкубировали 30 мин при 30°C, суспензию эритроцитов отсасывали, клетки отмывали, лизировали в 0,09% гипотоническом растворе NaCl и солюбилизировали в 1% додецилсульфате натрия; 100 мкл солюбилизата вносили в 96-луночные планшеты и фотометрировали при 405 нм, используя 8-канальный спектрофотометр ("Titertek"). Активность Fc-рецепторов на мембранах макрофагов определяли аналогичным способом после инкубации опсонизированных ЭБ в течение 30 мин при 4°C.

Активность МАФ в среде культивирования спленоцитов определяли, используя хемилюминесцентный метод, основанный на способности МАФ индуцировать генерацию АКМ в макрофагах [1]. Для этого мышинные спленоциты инкубировали в среде Б в присутствии и в отсутствие ОС (в концентрации 5 мкг/мл) в течение 24 ч при 37°C. Затем клетки отмывали в среде Хенкса и культивировали в среде Б, содержащей 5 мкг/мл конканавалина А (Кона) в течение 48 ч. Среду фильтровали через фильтры (размер пор 25 мкм) и добавляли в среду культивирования ПМ до конечной концентрации 10%. Активность МАФ оценивали

по интенсивности ХЛ в присутствии среды культивирования Кона-стимулированных спленоцитов по сравнению с величиной ХЛ в присутствии среды от нестимулированных спленоцитов.

Пролиферативную активность в СКЛ определяли по включению ^3H -тимидина в клетки. Мононуклеарные клетки получали из периферической крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте фикола—верографина. Клетки-стимуляторы получали после обработки мононуклеаров с 25 мкг/мл митомицина С и смешивали с клетками-респондерами в соотношении 1:1. Клетки культивировали 6 дней в среде А, содержащей 20% человеческой сыворотки IV (АВ), в присутствии или в отсутствие ОС при 37°C в 96-луночном планшете ("Linbro"). Затем в каждую лунку добавляли 37 кБк ^3H -тимидина и после 18 ч инкубации подсчитывали ассоциированную с клетками радиоактивность в сцинтиллаторе на основе диоксана.

Определение Ia-ИФ осуществляли в культуре СКЛ после предварительной инкубации клеток-респондеров и клеток-стимуляторов в присутствии и в отсутствие ОС в течение 18 ч. Затем клетки смешивали (1:1) и СКЛ культивировали, как описано ранее. Активность Ia-ИФ в среде СКЛ определяли в культуре человеческих моноцитов, используя флюоресцентно-меченные моноклональные антитела к HLA-DR-антигенам по методу [3].

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя непараметрический тест Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение. Как известно, некоторые ОС, такие, как 7-кето-Хс и 7-ОН-Хс, образуются в результате аутоокисления Хс в липопротеидах низкой плотности плазмы крови, в то время как другие соединения этого класса стероидов (такие, как 25-R-, 24-S-, 25- и 27-ОН-Хс) могут быть продуктами внутриклеточного гидроксилирования Хс, катализируемого некоторыми монооксигеназами [9]. В данной работе мы исследовали 2 представителя ОС: 7-кето-Хс — продукт аутоокисления Хс, а также 25-ОН-Хс — возможный продукт внутриклеточного гидроксилирования Хс. При исследовании влияния ОС на генерацию АКМ в макрофагах 25-ОН-Хс, 7-кето-Хс и Хс преинкубировали с ПМ в течение 24 ч и оценивали индуцируемую зимозаном люминолзависимую ХЛ в течение 30 мин. Как видно на рис. 1, 7-кето-Хс в концентрации более 2 мкг/мл значительно снижал генерацию АКМ в макрофагах, в то же время 25-ОН-Хс и Хс не влияли на этот показатель. Поскольку интенсивность люминолзависимой ХЛ напрямую связана с активацией мембраносвязанной

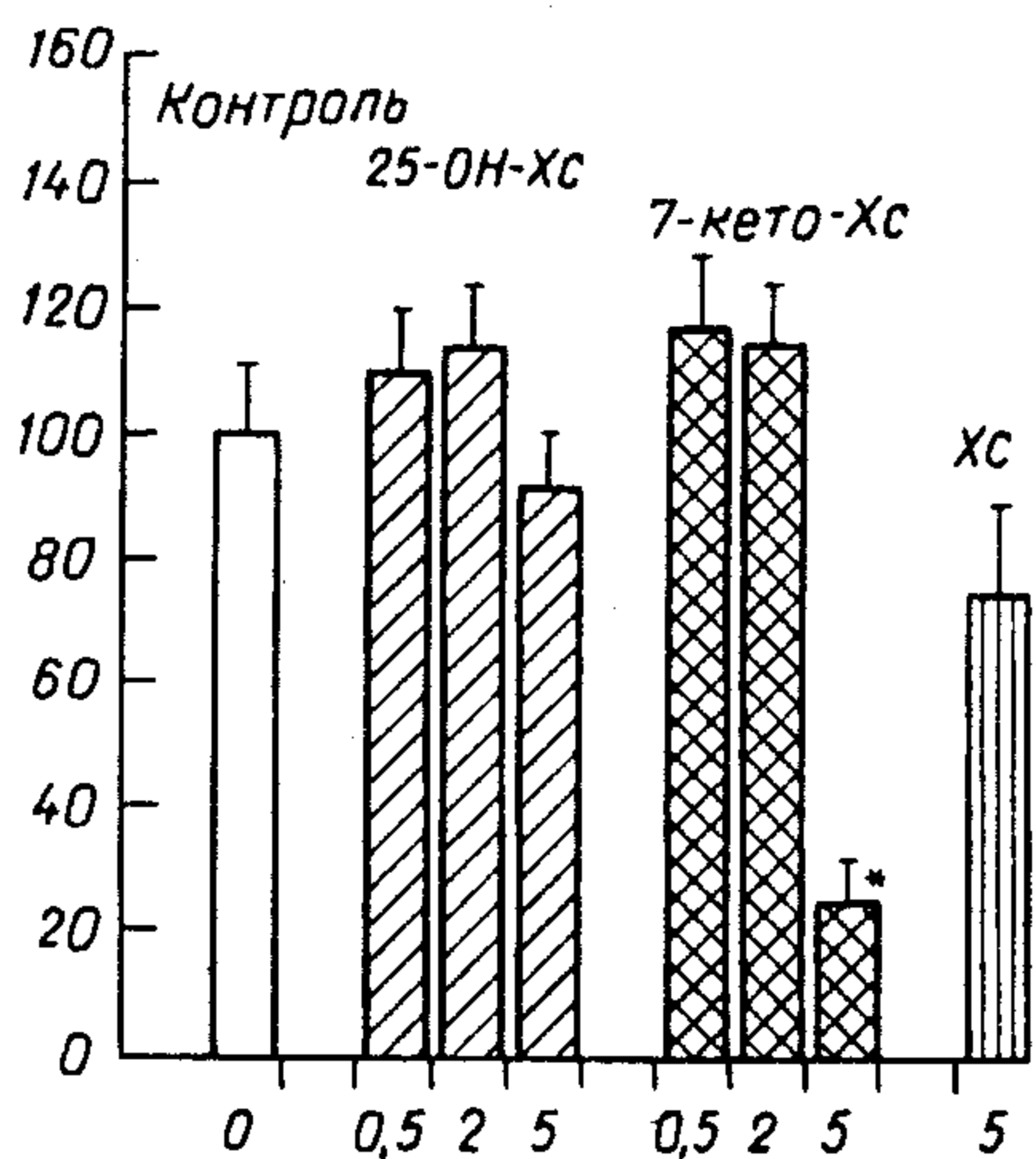


Рис. 1. Влияние 25-ОН-Хс, 7-кето-Хс и Хс на стимулированную зимозаном люминолзависимую ХЛ в культуре ПМ.

По оси абсцисс — концентрация стероидов (в мг/мл); по оси ординат — интенсивность ХЛ, мера выработки АКМ (в % от контроля; контрольная величина ХЛ составляла $(68,3 \pm 24,2) \cdot 10^3$ имп/мин на 10^6 клеток). Здесь и на рис. 2—6 звездочка — $< 0,05$ по сравнению с контролем.

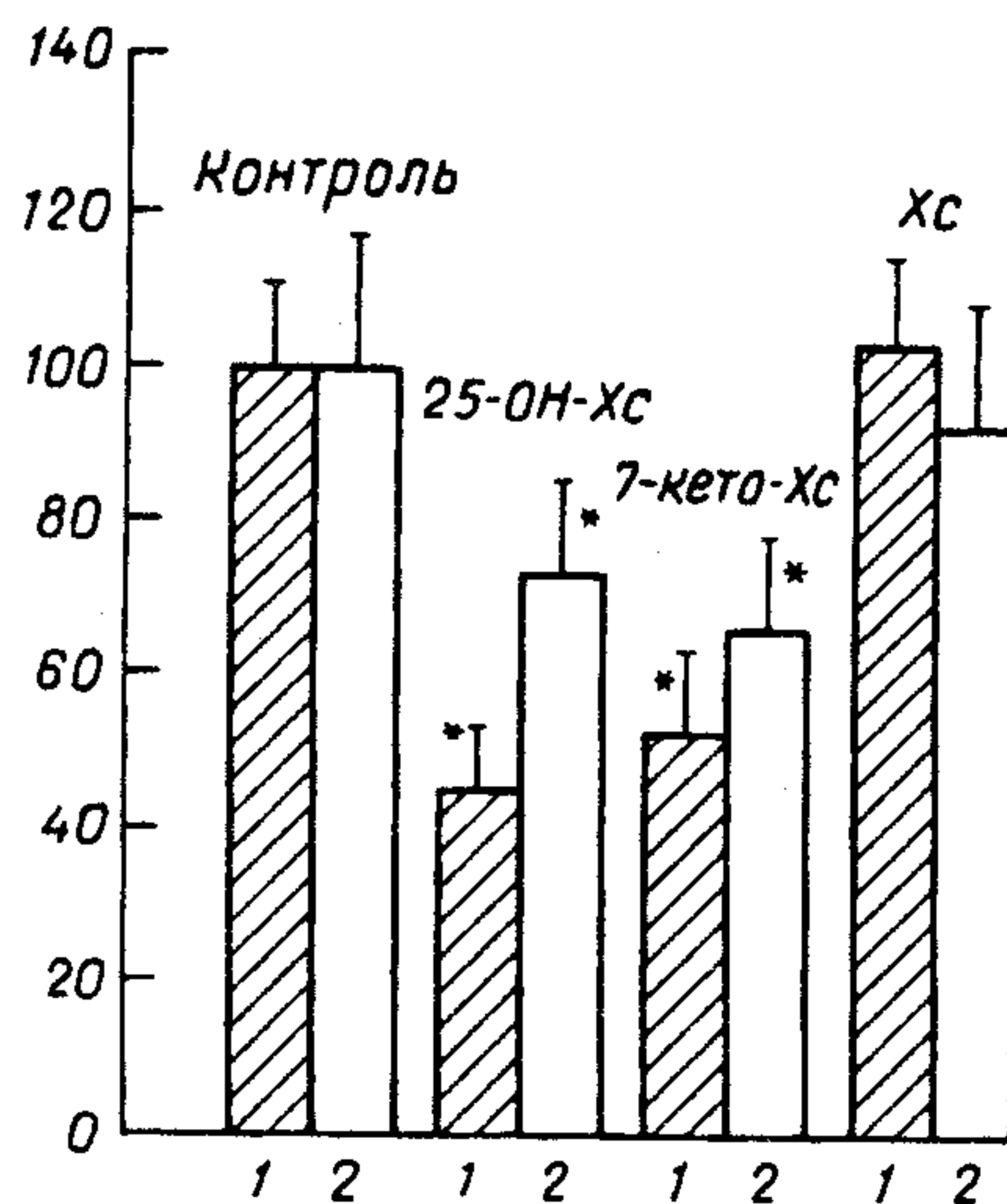


Рис. 2. Влияние Хс, 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс в концентрации 5 мкг/мл на Fc-зависимое связывание (1) и фагоцитоз (2) опсонизированных ЭБ.

По оси ординат — связывание и фагоцитоз ЭБ (в % от контроля; контрольная величина 100% соответствовала $0,584 \pm 0,11$ OD₄₀₅ для Fc-зависимого связывания и $0,754 \pm 0,08$ OD₄₀₅ для фагоцитоза).

НАДФ·Н-оксидазы, различия в действии 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс, вероятно, объясняются способностью этих стероидов модифицировать мембрану ПМ. Так, известно, 7-кето-Хс способен эффективно связываться с плазматической мембраной клеток, изменяя структуру мембран и ингибируя мембраносвязанные ферменты. 25-ОН-Хс в значительно меньшей степени способен изменять липид-белковые взаимодействия в мембране, однако этот стероид может выступать в качестве депрессора или индуктора биосинтеза мРНК белков, вовлеченных в сохранение гомеостаза Хс в клетке [8, 9].

Важными функциями макрофагов в иммунном ответе являются фагоцитоз антигена при участии Fc-рецепторов на поверхности клеток и продукция цитокинов (таких, как ИЛ-1). Исследование влияния ОС на экспрессию и связывающую способность Fc-рецепторов показало, что как 25-ОН-Хс, так и в равной мере 7-кето-Хс ингибируют Fc-зависимое связывание и фагоцитоз опсонизированных ЭБ, в то время как Хс не влияет существенно на эти показатели (рис. 2). Преинкубация ПМ с 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс приводила к снижению секреции ИЛ-1 (рис. 3). При этом 25-ОН-Хс дозозависимо снижал активность ИЛ-1 в ПМ, в то время как 7-кето-Хс оказывал депрессивное действие на этот показатель только в максимальной дозе (5 мкг/мл). Хс в эквивалентной концентрации не оказывал существенного влияния на секрецию ИЛ-1.

Известно, что лимфоциты продуцируют факторы, необходимые для активации и полноценного участия макрофагов в иммунном ответе. В число таких цитокинов входят МАФ и Ia-ИФ. Результаты исследования, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что преинкубация спленоцитов мыши с ОС приводила к снижению Кона-индуцированной продукции МАФ. При этом 25-ОН-Хс ингибировал продукцию МАФ в зависимости от дозы и действие этого ОС на данный показатель было более значительным, чем влияние 7-кето-Хс, вводимого в инкубационную среду спленоцитов в эквивалентных концентрациях. Очищенный Хс,

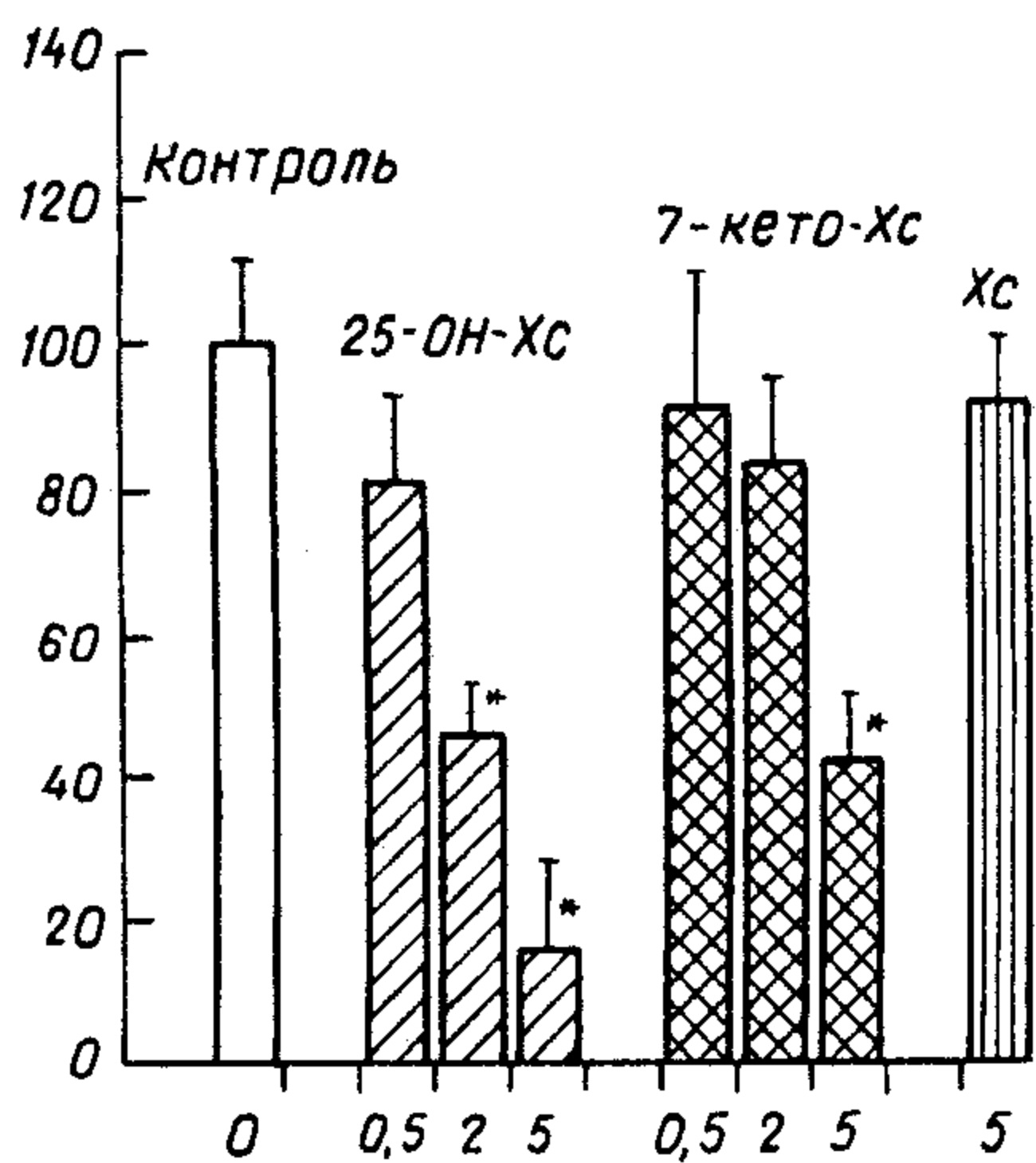


Рис. 3. Влияние Хс, 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс на продукцию ИЛ-1 в культуре ПМ.

По оси абсцисс — концентрация стероидов в культуральной среде (в мг/мл); по оси ординат — пролиферативная активность тимоцитов, мера активности ИЛ-1 (в % от контрольного уровня; контрольная величина, принятая за 100%, составляла $(12,7 \pm 4,9) \cdot 10^3$ имп/мин).

как и в предыдущих экспериментах, оказывал недостоверное действие на продукцию МАФ в культуре спленоцитов. Как показано на рис. 5, и 25-ОН-Хс, и 7-кето-Хс ингибировали пролиферацию клеток в СКЛ. При этом преинкубация ОС со стимулирующими клетками вызывала более высокий ингибирующий эффект, чем преинкубация ОС с клетками-респондерами. Максимальный ингибирующий эффект ОС наблюдался после их прямого добавления в СКЛ. Полученные результаты соответствуют данным литературы о том, что ОС в эквивалентных концентрациях ингибируют пролиферацию лимфоцитов, индуцируемую различными антигенными и митогенными стимулами. В то же время преинкубация с ОС приводила к снижению Ia-индуцирующей активности в среде инкубации лимфоцитов, которая оценивалась по способности культуральной среды, полученной от СКЛ, стиму-

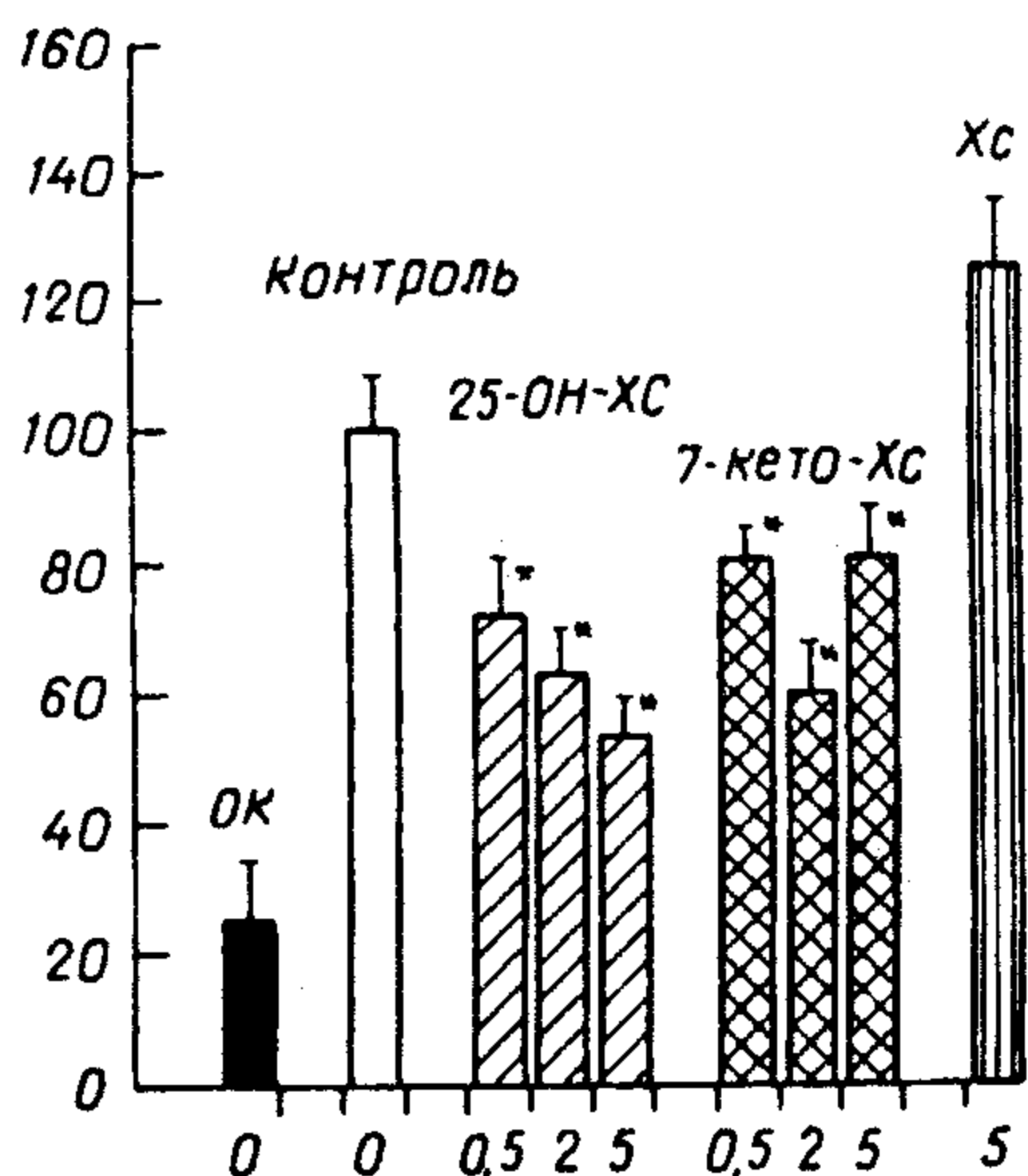


Рис. 4. Влияние Хс, 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс на продукцию МАФ в культуре спленоцитов мыши.

По оси абсцисс — концентрация стероидов (в мг/мл); по оси ординат — ХЛ, мера активности МАФ (в % от контрольной величины; контрольная величина активности МАФ, принятая за 100%, соответствовала $(114,2 \pm 29,3) \cdot 10^3$ имп/мин на 10^6 клеток), ОК — величина ХЛ в присутствии среды от нестимулированных спленоцитов.

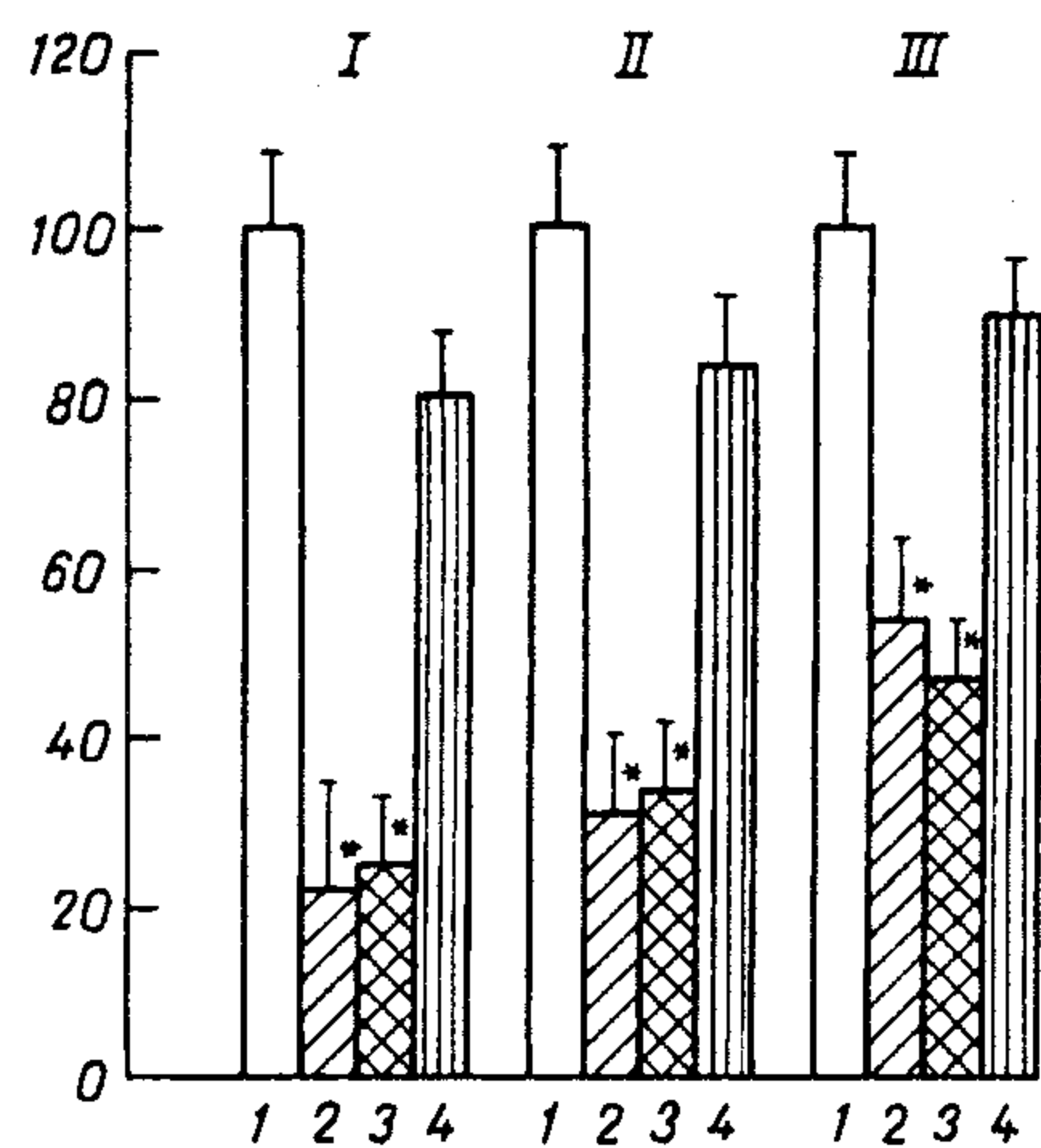


Рис. 5. Влияние Хс, 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс в концентрации 5 мкг/мл на пролиферацию клеток в СКЛ.

I — прямое введение стероидов в среду инкубации СКЛ; II — предварительная преинкубация клеток-респондеров со стероидами; III — предварительная преинкубация клеток-стимуляторов со стероидами. По оси ординат — включение ^3H -тимидина в клетки (в % от контроля; контрольный уровень, принятый за 100%, составлял $(4,5 \pm 0,9) \cdot 10^3$ имп/мин на 10^6 клеток). 1 — контроль, 2 — 25-ОН-Хс, 3 — кето-Хс, 4 — Хс.

лировать экспрессию HLA-DR-антигенов на моноцитах человека (рис. 6). Ранее С. Моог и соавт. [11] показали, что при внутрибрюшинном введении 7,25-ОН-Хс наблюдается снижение экспрессии антигенов II класса на ПМ мыши. Авторы попытались объяснить полученные результаты повышенной индукцией синтеза простагландина E_2 , однако введение ингибиторов продукции простагландина E_2 не вызывало отмену эффекта ОС. Исходя из полученных нами данных, можно предполагать, что снижение экспрессии антигенов II класса на мембранах макрофагов может быть связано с ингибированием ОС продукции Ia-ИФ в лимфоцитах.

В последние годы появилось большое число работ, в которых атеросклероз сосудов рассматривается как хроническая воспалительная реакция [2]. Показано, что инфильтрация моноцитов в зонах

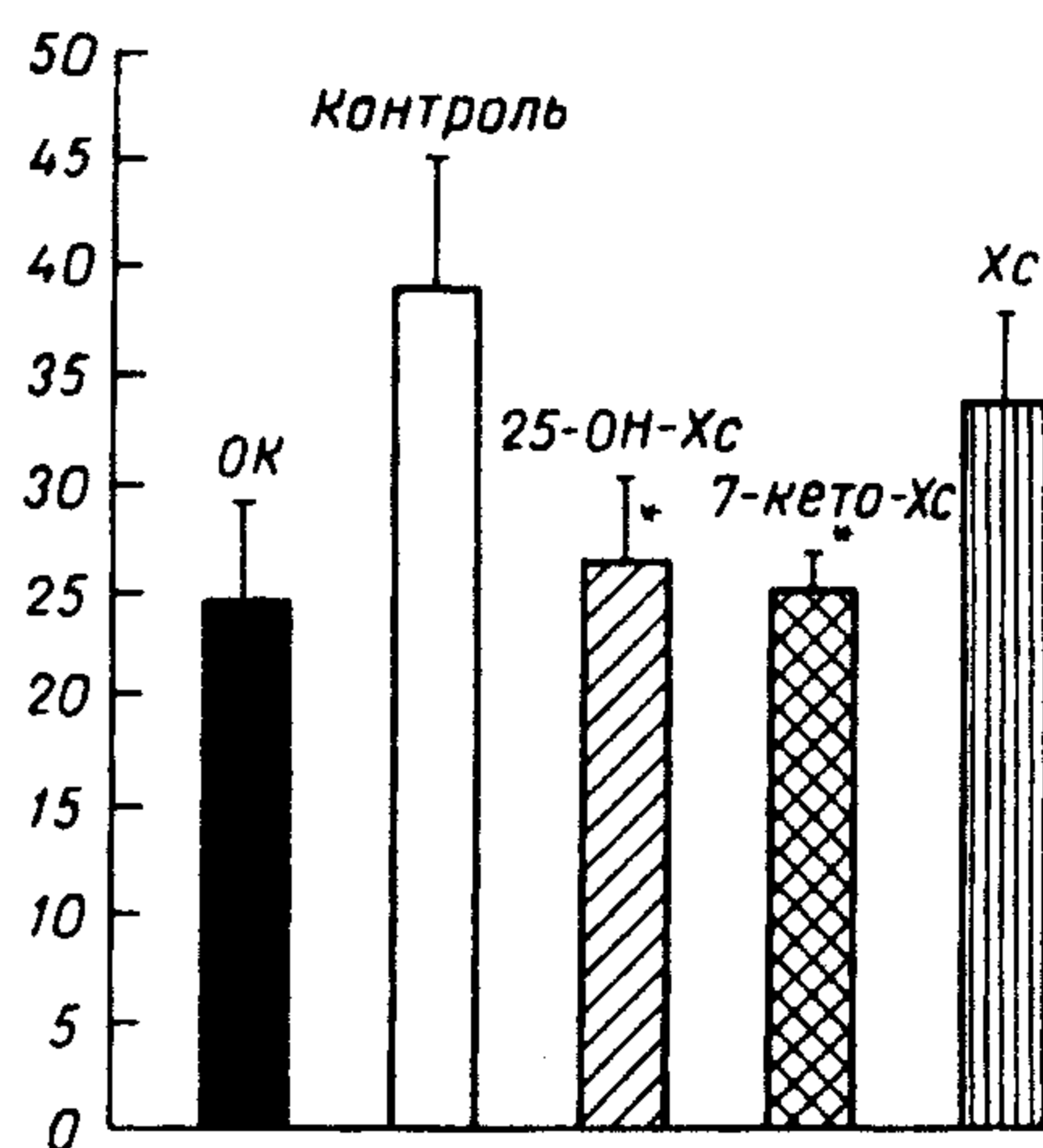


Рис. 6. Влияние Хс, 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс в концентрации 1 мкг/мл на продукцию Ia-ИФ в смешанной культуре лимфоцитов человека.

По оси ординат — количество HLA-DR-позитивных клеток в культуре человеческих моноцитов (в % от общего числа клеток).

атеросклеротических поражений сопровождается повышением уровней ИЛ-1 и мРНК фактора некроза опухоли, а также других воспалительных цитокинов. Наряду с этим в атеросклеротических бляшках обнаружены высокие концентрации ОС как внеклеточного, так и внутриклеточного происхождения [4]. Полученные в настоящей работе данные позволяют предположить, что депрессия ОС некоторых функций макрофагов и лимфоцитов, приводящая к нарушению макрофаг-лимфоцитарных взаимодействий, может являться причиной хронизации воспалительного процесса в стенках сосудов.

Выводы

1. В культуре ПМ мыши 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс ингибировали Fc-зависимое связывание и фагоцитоз ЭБ и секрецию ИЛ-1. Кроме того, 7-кето-Хс (но не 25-ОН-Хс) супрессировал индуцируемую зимозаном люминолзависимую ХЛ.

2. В культуре спленоцитов мыши 25-ОН-Хс и с меньшей эффективностью 7-кето-Хс супрессировали продукцию МАФ.

3. Преинкубация ОС с клетками-стимуляторами и клетками-респондерами в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов из крови человека, а также прямое добавление 25-ОН-Хс и 7-кето-Хс в СКЛ приводили к ингибированию пролиферации и секреции Ia-ИФ в СКЛ, снижая количество HLA-DR-позитивных моноцитов.

4. Хс в эквивалентных концентрациях не оказывал существенного влияния на исследованные функции лимфоцитов и макрофагов.

Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 96-04-49940) и Российским фондом приоритетных исследований в области медицины по программе "Атеросклероз" (№ 601).

ЛИТЕРАТУРА

1. Любимов Г. Ю., Зенков Н. К., Вольский Н. Н. // Иммунология. — 1992. — № 1. — С. 40—43.
2. Нагорнев В. А., Зота Е. Г. // Успехи соврем. биол. — 1996. — Т. 116, № 3. — С. 320—331.
3. Селедцов В. И., Сулов А. П., Брондз Б. Д. // Иммунология. — 1987. — № 1. — С. 36—39.
4. Bjorkhem I., Anderson O., Diczfalussy U. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 8592—8596.
5. Dushkin M. I., Zenkov N. K., Menshikova E. B. et al. // Atherosclerosis. — 1995. — Vol. 114. — P. 9—18.
6. Kostyuk V. A., Komura S., Yagi K. // Biochem. int. — 1985. — Vol. 11. — P. 803—808.
7. Kucuk O., Stonerpick S., Yachnin S. et al. // Lipids. — 1994. — Vol. 29. — P. 657—660.
8. Lund E., Bjorkhem I. // Accounts chem. Res. — 1995. — Vol. 28. — P. 241—249.
9. Luu B., Moog C. // Biochimie. — 1992. — Vol. 73. — P. 1317—1320.
10. Moog C., Luu B., Beck S. P. et al. // Int. J. Immunopharmacol. — 1988. — Vol. 10. — P. 511—516.
11. Moog C., Waltzinger Y. H. C., Luu B., Birschoff P. // Immunology. — 1990. — Vol. 70. — P. 344—350.
12. Phillips R., Rabson A. R. // Lab. Immunol. — 1983. — Vol. 11. — P. 101—104.
13. Rummage J. A., Lev R. W. // J. immunol. Meth. — 1985. — Vol. 77. — P. 155—163.
14. Smith L. L., Jonson B. N. // Free Radic. Biol. Med. — 1989. — Vol. 7. — P. 285—332.
15. Wu G. S., Goto H., Sevanian A., Rao H. A. // Ibid. — 1990. — Vol. 9. — P. 148.

Поступила 20.01.97

IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY OF OXYSTEROLS —
M. I. Dushkin, Ya. Sh. Shwartz, N. N. Volsky, M. I. Musatov,
Yu. I. Ragino, O. M. Perminova, V. A. Kozlov

Summary. The study was made of the effects of 25-hydroxycholesterol (25-OH-Ch), 7-keto-cholesterol (7-keto-Ch) in doses 1-5 µg/ml as well as of purified cholesterol upon some functions of cultured murine peritoneal macrophages (PM) and human blood lymphocytes. 7-keto-Ch, but not 25-OH-Ch significantly inhibited zymosan-stimulated PM reactive oxygen intermediates generation. Both 25-OH-Ch and 7-keto-Ch suppressed PM IL-1 secretion, FcR-dependent binding and phagocytosis of sheep red blood cells, secretion of MAF by cultured murine splenocytes, proliferative activity and secretion of Ia-inducing factors in human blood mixed lymphocyte culture. Purified cholesterol did not alter these parameters. These data show that some inflammatory functions of macrophages and lymphocytes may be modified by such environmental conditions as the presence of oxysterols.