

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛЕСТЕРИНА НА ЛИМФОКИНСТИМУЛИРОВАННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МАКРОФАГОВ И ПЕРВИЧНУЮ АЛЛОГЕННУЮ СМЕШАННУЮ КУЛЬТУРУ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

М.И.Мусатов, М.И.Душкин, Н.Н.Вольский,
О.М.Перминова, В.И.Коненков, В.А.Козлов

Институт клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН; Институт терапии Сибирского отделения РАМН, Новосибирск

Продукты окисления холестерина — 25-оксихолестерин и 7-кетохолестерин в дозе 1 мкг/мл значительно угнетают пролиферативный ответ в первичной одноплатной смешанной культуре лимфоцитов человека, не влияя при этом на уровень спонтанной пролиферации. Предварительное 18-часовое раздельное культивирование стимулирующих и отвечающих клеток с этими липидами показало, что ингибирование пролиферации связано с влиянием как на стимулирующие, так и в большей степени на отвечающие клетки. В этой же дозе соединения снижают накопление HLA-DR-позитивных макрофагов в стимулированной лимфокинсодержащим супернатантом 4-суточной культуре прилипающих клеток периферической крови.

Ключевые слова: окисленные формы холестерина, макрофаги, HLA-DR-экспрессия, смешанная культура лимфоцитов

В атеросклеротических очагах процессы клеточной активации и иммунного распознавания за счет гиперэкспрессии HLA-DR связываются с продукцией лимфокинов инфильтрирующими CD4⁺-Т-лимфоцитами [5,7,8]. С другой стороны, при обсуждении взаимосвязи нарушений холестеринного обмена и функций макрофагов при атеросклерозе привлекает внимание роль окисленных форм холестерина (ХС) [1,6]. В частности, известен антипролиферативный эффект 25-оксихолестерина (25-ОХС) и 7-кетохолестерина (7-КХС) и при активации макрофагов возможно увеличение их продукции [1,2]. Возникает вопрос — способны ли 25-ОХС и 7-КХС влиять на процессы дифференцировки макрофагов и эффективность иммунного распознавания? В настоящей работе изучено влияние этих соединений *in vitro* на первичную аллогенную смешан-

ную культуру лимфоцитов человека и экспрессию HLA-DR в ходе дифференцировки макрофагов из периферических моноцитов в условиях лимфокинной стимуляции.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

25-ОХС и 7-КХС выделяли из смеси окисленных продуктов ХС методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии, как описано ранее [2]. Липиды растворяли в свежеперегнанном этаноле и вводили в культуры с таким расчетом, чтобы конечная концентрация этанола в среде всегда была 0.1%. Одним из контролей было введение в культуры этанольного раствора ХС соответствующей концентрации.

Мононуклеарные клетки выделяли из стабилизированной двуназатриевой солью ЭДТА веноз-

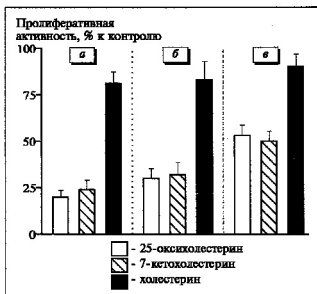


Рис. 1. Подавление пролиферативного ответа в первичной однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов человека под влиянием окисленных производных холестерина. а — добавление липидов; б — после предварительного культивирования с липидами отвечающих клеток; в — с липидами стимулирующих клеток. Данные по 8 здоровым лицам.

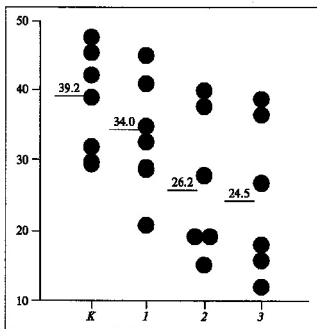


Рис. 2. Снижение относительной численности HLA-DR-экспрессирующих макрофагов в лимфокиностимулированных культурах под влиянием окисленных производных холестерина.

По оси ординат — процент HLA-DR-позитивных макрофагов. К — культивирование в присутствии комплекса лимфокинов; 1 — добавление холестерина; 2 — оксистерина; 3 — 7-кетохолестерина.

Точки 1-6 соответствуют индивидуальным данным 6 доноров. Цифры над линиями — средние арифметические содержания DR-позитивных клеток.

ной крови доноров центрифугированием на градиенте фиколю-верографина ($d=1.078 \text{ г/см}^3$). Донорами являлись 8 мужчин и 6 женщин — практически здоровые сотрудники Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН в возрасте 25-45 лет. Первичное однонаправленное смешанное культивирование лимфоцитов человека (СКЛ) осуществляли с использованием 20% пулированной АВ (IV) сыворотки, как описано ранее [3]. В другой серии экспериментов стимулирующие и отвечающие клетки предварительно культивировали с липидами в дозе 1 мкг/мл в течение 18 ч и после 2 отмываний проводили СКЛ. Реакцию учитывали к концу 6-х суток по включению ^3H -тимидина.

В дозе 1 мкг/мл липиды использовали в культуре прилипающих клеток периферической крови. Как источник комплекса лимфокинов использовали супернатант двунаправленной СКЛ — применение этого подхода описано в культуре лимфоцитов мыши [4]. В настоящей работе этот принцип использован в культуре мононуклеарных клеток человека: 5×10^6 клеток в 200 мкл среды [3], но с 10% фетальной телячьей сыворотки, инкубировали в плоскостонном планшете 1.5 ч при 37°C , непрлипающие клетки удаляли, а прилипающие клетки культивировали в течение 4 сут в 100 мкл среды с 50 мкл супернатанта от двухсуточной двунаправленной СКЛ как источника комплекса лимфокинов, хранившегося при -70°C . По окончании культивирования долю HLA-DR-позитивных макрофагов определяли микроскопически по включению трипанового синего после комплементзависимого порирования с использованием моноклональных антител к неполиморфным HLA-DR (ИКО-1, Онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН).

Результаты оценивали с использованием критерия Вилкоксона для сопряженных пар и критерия Вилкоксона—Манна—Уитни для несвязанных выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ пролиферативной активности в 6 СКЛ не выявил статистически значимых различий в уровнях как спонтанной, так и стимулированной пролиферации в зависимости от использованных доз липидов, добавляемых в культуру (5, 1 и 0.1 мкг/мл). Поэтому во всех последующих экспериментах использовали дозу 1 мкг/мл. Введение в культуру липидов в этой дозе не меняло уровня спонтанной пролиферации лимфоцитов, как не менял ее и растворитель (0.1% эта-

нода в среде): уровни спонтанной пролиферации к концу 6-х суток в присутствии этанола и без него составили 509 ± 105 и 468 ± 96 имп/мин ($p > 0.05$). Не отличались от контроля и уровни спонтанной пролиферации в присутствии 25-ОХС, 7-КХС и ХС — соответственно, 570 ± 70 , 514 ± 58 и 427 ± 109 имп/мин. В силу этого корректно использование индекса стимуляции (частного от деления значений стимулированной пролиферации на значения спонтанной пролиферации). Достоверного эффекта этанол не оказывал и на стимулированную пролиферацию — индекс стимуляции равнялся 4.38 ± 1.2 в его присутствии и 4.55 ± 1.04 в контроле ($p > 0.05$). Не наблюдали эффектов растворителя и при культивировании адгезивных клеток.

25-ОХС и 7-КХС оказывали выраженный подавляющий эффект на пролиферацию в СКЛ — индекс стимуляции составил, соответственно, 0.93 ± 0.71 и 1.14 ± 0.21 ($p < 0.01$). Если принять контрольную пролиферацию за 100%, то в присутствии этих липидов ответ снижен, соответственно, на 79.6 и 75%. Холестерин оказывал значимый ($p < 0.05$), но умеренный эффект — индекс стимуляции 3.73 ± 0.85 или на 19.1% меньше контроля (рис. 1, а).

Тот факт, что 25-ОХС и 7-КХС резко снижают стимулированную пролиферацию в СКЛ и не влияют на уровень спонтанной пролиферации, очевидно, показывает, что “антипролиферативный эффект” этих продуктов реализуется на уровне индукции активационного сигнала.

Предварительное 18-часовое раздельное инкубирование отвечающих и стимулирующих клеток показало, что подавление пролиферации связано с воздействием изучаемых веществ на стимулирующие клетки (рис. 1, в; $p < 0.01$), однако в большей степени на отвечающие клетки (рис. 1, б; $p < 0.01$). Эффект ХС остается таким же умеренным.

Действие ХС на накопление HLA-DR-позитивных макрофагов под влиянием комплекса лимфокинов (рис. 2, 3) в использовавшейся выборке (6 доноров) не является статистически зна-

чимым ($p > 0.05$), можно отметить лишь тенденцию к снижению показателя); в то время как под влиянием продуктов окисления ХС (рис. 2, 1, 2) DR-экспрессирующих макрофагов в обоих случаях становится существенно меньше ($p < 0.01$). В данном случае средние тенденции не являются показательными, но можно отметить, что по сравнению с контрольными культурами (т.е. с культурами без экзогенных липидов, но с комплексом лимфокинов, рис. 2, К), 25-ОХС снижает численность DR-экспрессирующих макрофагов в среднем на 20% (7-60%), а 7-КХС — на 38.5% (12-65%). В контрольных культурах в отсутствие комплекса лимфокинов также происходит дифференцировка периферических моноцитов в DR-позитивные макрофаги (на рис. 2 не показано), но их количество не отличается от культуры в присутствии комплекса лимфокинов и окисленных форм ХС. Иными словами, в данных экспериментах воздействующие 25-ОХС и 7-КХС отменяет стимулирующее влияние комплекса лимфокинов.

Таким образом, 25-ОХС и 7-КХС способны оказывать отрицательный эффект на выраженность процессов дифференцировки макрофагов и индукции антигенспецифической пролиферации, влияя как на антигенпредставляющие, так и на антигенраспознающие клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М.И. // Успехи соврем. биол. - 1991. - Т. 52. - С. 845.
2. Душкин М.И., Мандрикова Е.В., Любимов Г.И. и др. // Биохимия. - 1990. - Т. 55. - С. 1607.
3. Мусатов М.И., Коненков В.И., Лозовой В.П. // Иммунология. - 1987. - № 6. - С. 36.
4. Селедцов В.И., Суслев А.П., Брондз Б.Д. // Там же. - № 1. - С. 36.
5. Camejo E.H., Rosengren B., Camejo G. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 1995. - Vol. 15. - P. 1456.
6. Mitchison M.J., Ball R.Y., Carpenter K.H. et al. // Biochem. Soc. Trans. - 1990. - Vol. 18. - P. 1066.
7. Stemme S., Faber B., Holm J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol. 92. - P. 3893.
8. Wal van der A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., Das P.K. // Circulation. - 1994. - Vol. 89. - P. 36.

Поступила 02.12.96