

## ЛАБОРАТОРНАЯ МОДЕЛЬ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ

Институт клинической иммунологии, Новосибирск

**Цель.** Апробация лабораторной модели гиперлипидемии, индуцированной многократным введением полоксамера 407, на мышцах-гибридах (C57BL/6 x DBA/2)F<sub>1</sub>. **Материалы и методы.** В опытах использовали мышей-самок (C57BL/6 x DBA/2)F<sub>1</sub> в возрасте двух месяцев. Уровень дислипидемии оценивали, измеряя содержание холестерина в сыворотке крови методом с холестериноксидазой. **Результаты.** Подобраны дозы и сроки введения препарата для создания стойкой умеренной гиперхолестеринемии. Обнаружено, что вызванная таким методом дислипидемия сопровождается достоверным увеличением количества нейтрофилов в периферической крови животных. **Заключение.** Гиперлипидемия, вызываемая у мышей введением полоксамера 407, может быть использована в качестве удобной экспериментальной модели для комплексного изучения функций иммунной системы при патофизиологических состояниях, сопровождающихся нарушениями липидного метаболизма.

Журн. микробиол., 2010, № 3, С. 82—84

**Ключевые слова:** иммунная система, гиперлипидемия, нейтрофильные гранулоциты

Модель гиперлипидемии, индуцируемой введением животным полоксамера 407 (P407; другое его название — плуроник F-127), была предложена Johnston T.P. et al. более 10 лет назад как удобный тест-объект для изучения патогенеза атеросклеротических поражений артерий и для скрининга биологически активных веществ с антиатерогенными свойствами [5, 7, 8]. К настоящему времени этот коллектив авторов исследовал и описал разнообразные свойства данной модели, имеющие прямое или косвенное отношение к изменениям метаболизма липидов, которые приводят, в конечном итоге, к атероматозу аорты. В частности, показано, что введение P407 мышам вызывает резкое увеличение содержания триглицеридов и холестерина в периферической крови и что эти эффекты

## LABORATORY MODEL OF HYPERLIPIDEMIA

Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

**Aim.** Approbation of laboratory model of hyperlipidemia induced by multiple administration of poloxamer 407 to hybrid mice (C57BL/6 x DBA/2) F<sub>1</sub>. **Materials and methods.** Two-month-old female mice (C57BL/6 x DBA/2)F<sub>1</sub> were used for experiments. Level of dyslipidemia was assessed measuring cholesterol level in serum by method with cholesteroloxidase. **Results.** Dosages and timing of administration of the compound for inducing stable moderate hypercholesterolemia were selected. It was discovered that dyslipidemia induced by this method accompanied by reliable increase of neutrophils count in peripheral blood of animals. **Conclusion.** Hyperlipidemia induced in mice by administration of poloxamer 407 could be used for convenient experimental model for complex studies of immune system functions during pathophysiological conditions associated with lipid metabolism disorders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2010, No. 3, P. 82—84

**Key words:** immune system, hyperlipidemia, neutrophilic granulocytes

можно объяснить ингибированием активности двух ключевых ферментов: сывороточной липопротеинлипазы, расщепляющей триглицериды в ЛПНП и киломикронах, и холестерина 7 $\alpha$ -гидроксилазы, определяющей скорость катаболизма холестерина до желчных кислот [5]. Помимо экономичности и простоты этой модели ее важным достоинством является то, что в отличие от широко распространенных вариантов гиперлипидемических состояний, вызываемых у мышей с нокаутированными генами apoE или рецептора к ЛПНП, в данном случае контролируемая дислипидемия может быть индуцирована у мышей C57BL/6 с неизмененным генотипом.

Относительно недавно было показано, что вызванная введением P407 дислипидемия приводит к сдвигу Th1/Th2 соотноше-

ния в сторону Th2 [6]. Наши предварительные данные также говорят о сочетании нарушений липидного метаболизма у мышей, возникающих под влиянием этого препарата, с изменениями баланса Т-хелперов, который в значительной степени определяет параметры иммунного ответа на бактериальные и вирусные антигены. Таким образом, есть все основания предполагать, что предложенная Johnston T.P. et al. лабораторная модель может быть подходящим объектом для комплексного изучения функций иммунной системы в условиях дислипидемии. Ее применение должно расширить спектр существующих сегодня экспериментальных возможностей для решения этой актуальной иммунологической проблемы.

Цель работы — апробация модели гиперлипидемического состояния, индуцированного введением P407, на мышцах-гибридах (C57BL/6 х DBA/2)F<sub>1</sub>, а также подбор адекватных доз и сроков введения препарата для создания стойкой умеренной гиперлипидемии.

Экспериментальные исследования проведены на 150 мышцах-самках (C57BL/6 х DBA/2)F<sub>1</sub> в возрасте 2 месяцев, полученных из питомника СО РАМН и содержащихся на стандартной диете. Содержание животных до и в период проведения экспериментов осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Пробы крови забирали из хвостовых вен в количестве 5 мкл или из шейных сосудов при забое животных.

Гиперлипидемию индуцировали введением полноксамера 407, основываясь на методе, примененном в работе [7]. Препарат (Pluronic F-127, «Sigma») вводили внутривенно в различных дозах в 0,5 мл среды RPMI-1640. Животным контрольной группы в те же сроки вводили растворитель.

Выраженность гиперлипидемии оценивали по уровню холестерина в сыворотке крови, который определяли фотометрически по методу с холестериноксидазой, используя наборы Biosub CHOL («Biosol Diagnostics», Германия), и выражали в миллимолях на 1 литр (мМ).

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

В первой серии экспериментов было по-

казано, что через сутки после внутривенного введения P407 концентрация холестерина в сыворотке крови мышей значимо увеличивается. При этом в исследованном нами диапазоне доз (от 1,25 до 15 мг/мышь) уровень гиперхолестеринемии был пропорционален количеству вводимого препарата. В следующей серии опытов была изучена временная зависимость возникновения гиперлипидемии после однократного введения P407. Установлено, что использованные дозы препарата уже через 6 часов после введения более чем в 2 раза повышают уровень холестерина в сыворотке животных и это повышение, несмотря на существенные колебания данного показателя (возможно, связанные с кормлением животных), удерживалось в течение двух суток. Максимальная гиперхолестеринемия наблюдалась через 12 — 24 часа после введения P407, после чего значения этого показателя снижались, но даже через 48 часов существенно превышали уровень холестерина в сыворотке контрольных животных.

Исходя из полученных данных, была выбрана доза P407, равная 7,5 мг/мышь, которая вызывает у использованных нами мышцей-гибридов значительную гиперлипидемию, но в то же время, не выводит контролируемые параметры за пределы значений, обнаруживаемых у мышей при различных патофизиологических состояниях. Результаты опытов, в ходе которых препарат вводился в этой дозе через день в течение двух недель, показали, что в первые дни наблюдается некоторая кумуляция эффекта P407, вероятно, обусловленная накоплением препарата в организме, однако, в целом, уровень холестерина ритмически колеблется вокруг устойчивой средней величины, составляющей около 12 — 15 мМ, что в несколько раз превышает его среднее содержание в сыворотке контрольных животных (2,75 мМ).

Для проверки того, может ли функционирование иммунной системы изменяться при двухнедельном воздействии дислипидемии такого уровня, было исследовано влияние курса инъекций P407 на количество лейкоцитов в крови мышей. Показано, что даже такой относительно краткий срок существования иммунной системы животных в условиях дислипидемии может значимо влиять на некоторые параметры, определяющие ее функциональную активность. Несмотря на то, что курс инъекций P407 существенно не изменял общего ко-

личества лейкоцитов в крови мышей, содержание нейтрофильных гранулоцитов увеличивалось при этом на 86% ( $p < 0,001$ ), сигнализируя о значимых изменениях в этой системе.

Данные наших экспериментов говорят о том, что предложенная Johnston T.P. et al. модель гиперлипидемии [5, 8] вполне может быть использована не только для изучения патогенеза атеросклероза, как это предполагали ее авторы, но и для исследования взаимосвязей между параметрами липидного метаболизма и функциональной активностью клеток иммунной системы. Результаты ее применения на мышах-гибридах (C57BL/6 x DBA/2) $F_1$  показывают, что в этом случае уровень индуцированной введением P407 гиперхолестеринемии пропорционален дозе вводимого препарата и что с помощью его многократных инъекций можно легко поддерживать желаемую степень изменений липидного метаболизма, сочетающихся с соответствующими изменениями интенсивности и направленности иммунных реакций.

Используя данный метод как модель атерогенеза его авторы вводили P407 в больших дозах и в течение длительного срока (3 — 4 месяца) добивались появления атероматозных отложений в стенках аорты [3, 5]. Исходя из другой цели нами в качестве базового воздействия был выбран двухнедельный курс введения препарата в дозе, приводящей к развитию «умеренной» гиперлипидемии. Уже такое относительно кратковременное воздействие оказалось достаточным, чтобы вызвать заметный сдвиг в параметрах транспорта клеток иммунной системы, связанный, вероятно, с перестройкой ее функционирования в условиях измененного липидного метаболизма. Зарегистрированное увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови мышей с дислипидемией можно было бы предположительно объяснить повышенной активностью провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), как это показано при различных

стрессовых воздействиях или при введении бактериальных полисахаридов [1, 2]. Однако данные, полученные в сходных условиях [4], свидетельствуют, что P407 не стимулирует продукцию IL-6 как при введении мышам *in vivo*, так и в условиях *in vitro* (при непосредственном воздействии на эндотелиальные клетки и макрофаги). Таким образом, вопрос об интерпретации патофизиологических механизмов, связывающих наблюдающийся нейтрофилез с развитием дислипидемии, остается открытым, и его разрешение требует дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. М., Медицина, 1983.
2. Anisman H., Merali Z., Poulter M.O. et al. Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr. Pharm. Dis.* 2005, 11: 963-972.
3. Johnston T.P., Coker J.W., Paigen B.J. et al. Sex does not seem to influence the formation of aortic lesions in the P-407-induced mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002, 39: 404-411.
4. Johnston T.P., Li Y., Jamal A.S. et al. Poloxamer 407-induced atherosclerosis in mice appears to be due to lipid derangements and not due to its direct effects on endothelial cells and macrophages. *Mediators Inflamm.* 2003, 12: 147-155.
5. Johnston T.P. The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004, 43: 595-606.
6. Johnston T.P., Zhou X. Oxidation of low-density lipoprotein cholesterol following administration of poloxamer 407 to mice results from an indirect effect. *Ibid.* 2007, 49: 246-252.
7. Palmer W.K., Emeson E.E., Johnston T.P. Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse. *Atherosclerosis.* 1998, 136: 115-123.
8. Porter J.A., Carter B.L., Johnston T.P. et al. Effects of pravastatin on plasma lipid concentrations in poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats. *Pharmacotherapy.* 1995, 15: 92-98.

Поступила 13.09.09  
С переработки 08.12.09

Контактная информация: Нерминова Ольга Михайловна,  
630099, Новосибирск, ул. Ядринцовская, 14, ИКИ, р.т. 8(383)222-06-72