

*А.Ф.Повещенко, О.М.Перминова,
М.И.Душкин, П.О.Кузнецов,
Н.Н.Вольский, В.А.Козлов*

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ МЫШИ

Институт клинической иммунологии СО РАМН,
Институт терапии СО РАМН, Новосибирск

В эксперименте на мышах показано, что в/в введение ацетилированных липопротеинов низкой плотности (ацЛНП) в дозе 0,5 мг/мышь на 35% снижает величину гуморального иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ). Добавка ацЛНП к перитонеальным макрофагам мыши *in vitro* ингибировала Fc-зависимый фагоцитоз ЭБ и в 4 раза увеличивала секрецию ПГЕ₂ макрофагами. Обнаружено также, что оксистеролы — 25-гидроксихолестерин и 7-кетохолестерин — ингибируют Fc-зависимый фагоцитоз ЭБ при добавлении их к среде инкубирования макрофагов *in vitro* в дозах 0,5 — 5 мкг/мл. Сделан вывод о том, что окислительный метаболизм содержащихся в ЛНП холестерина и арахидоновой кислоты может опосредовать иммуномодулирующие эффекты модифицированных ЛНП.

Журн. микробиол., 2002, № 1, С. 57—60

Ключевые слова: ацетилированные липопротеины низкой плотности, оксистеролы, макрофаги, фагоцитоз, простагландины E₂, гуморальный иммунный ответ

В В Е Д Е Н И Е

В последние годы накоплены экспериментальные данные, доказывающие влияние различных классов липопротеинов, в том числе модифицированных липопротеинов низкой плотности (мЛНП), на функциональную активность иммунокомпетентных клеток (ИКК) [1, 14]. Установлено, что мЛНП могут существенно изменять эффекторную активность ИКК [10] и выделение ими иммунорегуляторных факторов [2]. Однако механизмы такого влияния мЛНП изучены еще недостаточно.

Известно, что основная часть мЛНП, контактирующих с ИКК, связывается со скэвенджер-рецепторами макрофагов (Мф) и интенсивно ими захватывается, что приводит к накоплению в этих клетках липидов, входящих в состав ЛНП, в частности холестерина и арахидоната, продукты метаболизма которых обладают выраженными иммуномодулирующими свой-

*A.F. Poveshchenko, O.M. Perminova,
M.I. Dushkin, P.O. Kuznetsov,
N.N. Volsky, V.A. Kozlov*

INFLUENCE OF MODIFIED LOW DENSITY LIPOPROTEINS ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES IN MICE

Institute of Clinical Immunology, Institute of Therapy
(Siberian Branch of the Russian Acad. Med. Sci.),
Novosibirsk, Russia

Intravenous injection of acetylated low density lipoproteins (acLDL) in mice in a dose of 0.5 mg per mouse decreased the intensity of humoral immune response to sheep red blood cells (SRBC) by 35%. The addition of acLDL to mouse peritoneal macrophages *in vitro* resulted in inhibition of Fc-dependent phagocytosis of SRBC and fourfold increased secretion of prostaglandins E₂ by macrophages. Fc-dependent phagocytosis of SRBC was also found to be inhibited by oxysterols (25-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol), added to the incubation medium of macrophages *in vitro* in doses of 0.5 — 5 mg/ml. The conclusion was made that oxidative metabolism of cholesterol and arachidonic acid, contained in LDL, may mediate the immunomodulating effects of modified LDL.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2002, No. 1, P. 57—60

Key words: acetylated low-density lipoproteins, oxysterols, macrophages, phagocytosis, prostaglandins E₂, humoral immune response

ствами. Цель работы — экспериментальное изучение возможной роли этих метаболических путей в развитии иммунорегуляторных эффектов мЛНП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 230 мышах-самцах (СВАхС57В1)F₁. 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).

ЛНП (1,019 — 1,063 г/мл) выделяли из плазмы (0,01% ЭДТА) крови доноров методом ультрацентрифугирования. Ацетилирование ЛНП проводили с использованием уксусного ангидрида [8].

Мф получали из перитонеального экссудата мышей на 4 сут после в/б введения

1,0 мл тиогликолевого бульона. Дальнейшую инкубацию Мф проводили в пластиковых планшетах в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 2мМ L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина, в увлажненной атмосфере (5% CO₂) при 37°C. Жизнеспособность Мф оценивали стандартным методом — по включению трипанового синего.

Исследуемые оксистеролы (ОС) — 25-гидроксихолестерин (25-ОХС) и 7-кетохолестерин (7-КХС) — вносили в среду инкубации в виде спиртовых р-ров, при этом 10 мкл этилового спирта всегда соответствовало 1 мл среды.

Интенсивность FcγR-опосредованного фагоцитоза опсонизированных эритроцитов барана (ЭБ) перитонеальными Мф мыши, преинкубированными с ацетилированными ЛНП (ацЛНП) или ОС, оценивали спектрофотометрическим методом после лизиса фагоцитов в 1% р-ре додецилсульфата натрия. Оптическую плотность определяли на 8-канальном спектрофотометре "Titertek", используя светофильтр с λ=405 нм [15].

Содержание простагландинов E₂ (ПГЕ₂) определяли радиоиммунологическим методом ("Dade", США) в средах, кондиционированных перитонеальными Мф мыши, преинкубированными с ацЛНП.

Для исследования влияния ацЛНП на иммунный ответ *in vivo* мышам внутривенно вводили ацЛНП в дозе 0,5 мг/мышь в 0,5 среды Дульбекко. Через 2 ч после введения ацЛНП животных иммунизировали, вводя в/в 2x10⁶ ЭБ. Гуморальный иммунный ответ оценивали на 4 сут после иммунизации по методу Cunningham [6], подсчитывая количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей.

Статистическая обработка результатов включала вычисление средних величин и их ошибок и оценку значимости различий с помощью непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В серии экспериментов, проведенных нами в условиях *in vivo*, были получены данные о супрессии иммунного ответа на ЭБ у мышей (СВАxС57В1)F₁ после введения им ацЛНП. У мышей, которым за 2 ч до иммунизации в/в вводили ацЛНП (в дозе 0,5 мг/мышь), наблюдали достоверное (p<0,01) снижение (на 35%) числа АОК (на 10⁶ спленоцитов) в селезенке животных по сравнению с контрольной группой

(контроль: АОК = 444±4,12; после инкубации с ацЛНП: АОК = 293±15,4).

Исходя из того, что мЛНП в иммунной системе связываются со скэвенджер-рецепторами Мф и активно поглощаются этими клетками, можно предположить, что одним из первичных эффектов ацЛНП на ИКК будет изменение функциональной активности Мф. Для проверки такого предположения в экспериментах *in vitro* мы исследовали влияние ацЛНП на интенсивность FcγR-опосредованного фагоцитоза опсонизированных ЭБ перитонеальными Мф мыши. На рис. 1 видно, что 4-час преинкубация Мф с ацЛНП приводила к подавлению фагоцитоза (максимальное ингибирование — 22%). При этом эффект ацЛНП имел отчетливую дозовую зависимость. Снижение дозы ацЛНП до 50 и 25 мкг/мл сопровождалось соответствующим уменьшением их ингибирующего влияния на фагоцитарную активность Мф.

Известно, что ЛНП содержат высокие концентрации арахидоната, являющегося субстратом для синтеза различных веществ с высокой биологической активностью, в том числе ПГЕ₂. Ранее нами было показано, что ПГЕ₂ способны ингибировать FcγR-опосредованный фагоцитоз ЭБ перитонеальными Мф мыши [11]. Для проверки возможной роли простагландинов в наблюдаемом подавлении фагоцитарной активности Мф мы исследовали влияние ацЛНП на продукцию ПГЕ₂ перитонеальными Мф мыши.

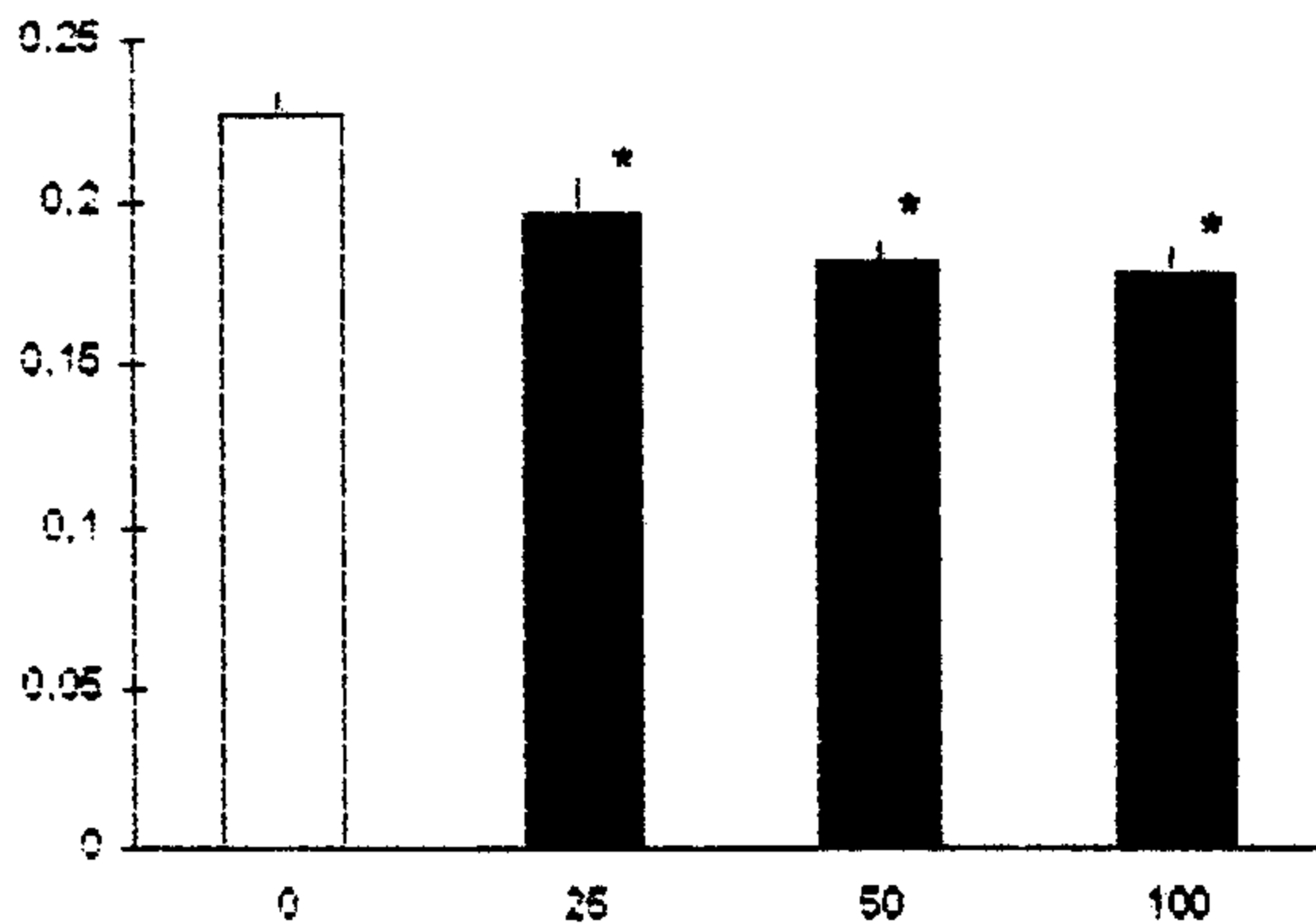


Рис. 1. Влияние 4-час инкубации клеток в среде с ацЛНП на фагоцитоз ЭБ перитонеальными Мф мышей *in vitro*.

По оси абсцисс — концентрация ацЛНП в мкг/мл, по оси ординат — интенсивность фагоцитоза в ед. ОД. Светлый столбик — контроль (инкубация без ацЛНП), темные — после инкубации в присутствии соответствующих концентраций ацЛНП. *Статистически достоверное отличие от контроля (p<0,001).

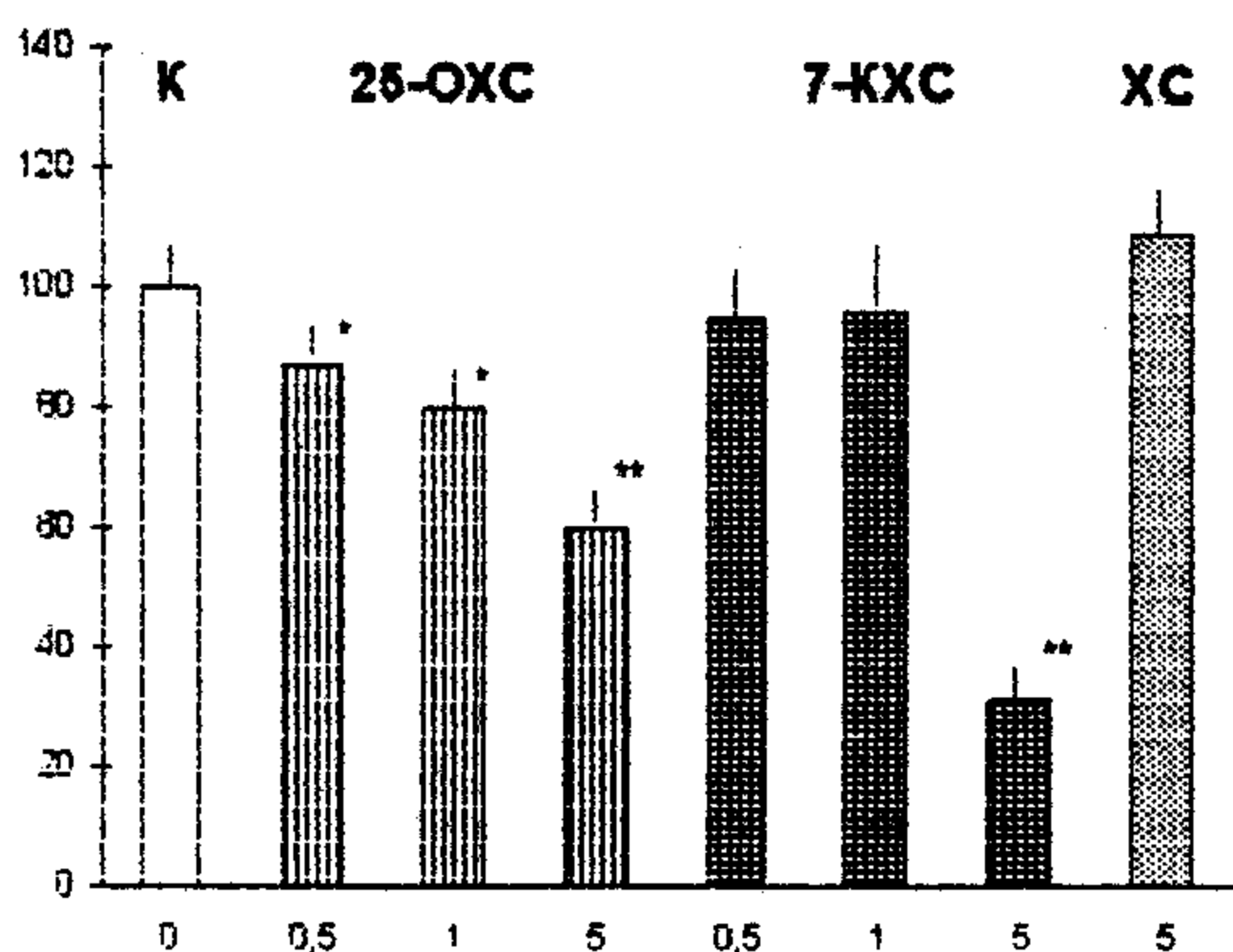


Рис. 2. Влияние оксистеролов на фагоцитоз ЭБ перитонеальными Мф мышей *in vitro*.

По оси абсцисс — концентрация стеролов в мкг/мл, по оси ординат — интенсивность фагоцитоза в % от контроля. К — контроль (без оксистеролов); 25-ОХС — 25-гидроксихолестерин; 7-КХС — 7-кетохолестерин; ХС — холестерин. *статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,01$). **статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,001$).

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что 4-час преинкубация Мф с ацЛНП (50 мкг/мл) приводит к увеличению секреции клетками простагландинов группы Е более, чем в 4 раза (с 1746 до 7226 мкг/мл). К концу 24-час преинкубации Мф с модифицированными липопротеинами уровень простагландинов Е не отличался от контрольного.

Другим биохимическим механизмом, опосредующим влияние мЛНП на функциональную активность Мф, может быть окислительный метаболизм холестерина. Известно, что добавление ацЛНП к культуре Мф сопровождается накоплением холестерина в клетках и это приводит к повышению концентрации эндогенных ОС [12], обладающих, как известно, иммуномодулирующими свойствами [14]. Исходя из этого, в следующей серии экспериментов *in vitro* мы изучили влияние двух представителей класса ОС — 25-ОХС и 7-КХС — на интенсивность FcγR-опосредованного фагоцитоза опсонизированных ЭБ перитонеальными Мф мыши.

Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2. Видно, что исследованные ОС в использованных концентрациях подавляют интенсивность FcγR-опосредованного фагоцитоза опсонизированных ЭБ Мф. При этом эффект 7-КХС был более выраженным (максимальное ингибирование: 7-КХС — 70%, 25-ОХС — 40%).

Снижение дозы 25-ОХС с 5 до 1 и 0,5 мкг/мл сопровождалось соответствующим уменьшением его ингибирующего влияния на фагоцитоз. Менее выражена дозовая зависимость у 7-КХС. Непродолжительная по времени (двух- и шестичасовая) преинкубация Мф с ОС не оказывала существенного влияния на фагоцитарную активность Мф.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по изучению влияния ацЛНП на синтез простагландинов группы Е МФ хорошо согласуется с данными других авторов, показавших, что мЛНП способны стимулировать образование продуктов как циклооксигеназного, так и липоксигеназного путей метаболизма арахидоновой кислоты в клетках [7].

ЛНП содержат высокие концентрации арахидоната, связанного с входящими в их состав холестерином и фосфолипидами. Известно также, что транспорт экзогенного арахидоната в клетку лимитируется скоростью захвата и деградацией липидов ЛНП в лизосомах. Поскольку мЛНП проявляют высокое сродство к скэвенджер-рецепторам и быстро метаболизируются в Мф, их стимулирующий эффект на синтез и секрецию ПГЕ₂ может быть связан с увеличением субстратного пути арахидоната в клетках. В то же время, связывание ацЛНП с рецепторами Мф может, по-видимому, непосредственно влиять на метаболизм эндогенного арахидоната. Так, было обнаружено, что уже через 10 мин после добавления к Мф ацЛНП увеличивается синтез ПГЕ₂ из меченой арахидоновой кислоты, введенной в клетки за 20 ч до этого [7]. Другими авторами на макрофагальной линии P388D₁ показано, что мЛНП повышают экспрессию циклооксигеназы-2, с активностью которой, как известно, ассоциирован синтез ПГЕ₂ в клетках [5].

Наблюдаемое в наших экспериментах снижение скорости продукции простагландинов группы Е к концу 24-час преинкубации Мф с ацЛНП может объясняться, как это предположено Habenicht A. et al. [9], ингибирующим влиянием ЛНП и образующихся в больших количествах ПГЕ₂ на РGH-синтазу. В наших условиях эксперимента увеличение продукции простагландинов Е в Мф и снижение интенсивности фагоцитоза ЭБ Мф после преинкубации клеток с ацЛНП совпадали по вре-

мени, что свидетельствует о возможном аутокринном действии ПГЕ₂ на фагоцитарную активность Мф.

Иммуномодулирующие эффекты мЛНП также могут быть связаны с присутствием в их составе ОС [4, 14] или с повышением концентрации ОС в клетках при преинкубации последних с мЛНП, о чем уже упоминалось выше. Показано, что ОС могут влиять на процессы антигенной презентации, снижая экспрессию молекул ГКГС II класса на клеточных мембранах [13], а также стимулировать синтез и секрецию клетками ПГЕ₂ [3]. Полученные нами результаты свидетельствуют также об ингибирующем действии ОС на фагоцитоз антигенов, а, следовательно, и на процессы их презентации.

Таким образом, на основании полученных результатов экспериментов и имеющихся в литературе данных можно считать, что иммунорегуляторные эффекты мЛНП могут опосредоваться различными биохимическими механизмами, важную роль среди которых могут играть повышение синтеза ПГЕ₂ и ОС в Мф. В то же время изменения скоростей окислительного метаболизма холестерина и арахидоната вследствие повышенного поступления этих субстратов в Мф в составе мЛНП приводят к одинаковым конечным эффектам, нарушая процессы фагоцитоза и презентации антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М.И., Корнюш Е.А., Поляков Л.М. и др. Биосинтез липидов и метаболизм нативных и ацетилированных ЛНП в макрофагах, стимулированных зимозаном *in vivo* и *in vitro*. Биохимия. 1992, 57 (8): 1181 — 1191.
2. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. Цитокины, иммунное воспаление и атерогенез. Успехи совр. биол. 1996, 116 (3): 320 — 331.
3. Astruc M.E., Lahoua Z. Potentiation by cholesterol and vitamin D3 oxygenated derivatives of arachidonic acid release and prostaglandin E₂ synthesis induced by the epidermal growth factor in NRK49F cells: the role of protein kinase C. Cell Signal. 1994, 6(4): 763 — 775.
4. Chang Y.H., Adballa D.S., Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. Free Radic. Biol. Med. 1997, 23(2): 202 — 214.
5. Claus R., Fyrnys B., Deigner H.P., Wolf G. Oxidized low-density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC-isotypes via prostaglandin-H-synthase in P388D1 macrophage-like cells. Biochemistry. 1996, 35 (11): 4911 — 4922.
6. Cunningham A.J., Szenberg A. Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. Immunology. 1968, 14 (3): 599 — 600.
7. Diez E., Fernandez B., Martin C. et al. Acetylated low density lipoproteins promote the release and metabolism of arachidonic acid by murine macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989, 161 (2): 461 — 467.
8. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated LDL, producing massive cholesterol deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76 (1): 333 — 337.
9. Habenicht A.J.R., Salbach P., Goerig M. et al. The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet-derived growth factor. Nature. 1990, 345 (6276): 634 — 636.
10. Juompan L., Fournie G.J., Benoist H. LDL and acetyl-LDL inhibit the NK activity and are taken up by CD56+ lymphocytes. Biochem. Biophys. Acta. 1994, 1224 (1): 1 — 10.
11. Kozlov V., Poveshchenko A., Gromykhina N. Some mechanisms involved in the prostaglandin E₂ immunosuppressive effect in (CBA x C57B₁)F₁ mice *in vivo*. Cell. Immunol. 1990, 128 (2): 242 — 249.
12. Maor L., Aviram M. Unesterified cholesterol and 7-ketocholesterol accumulate in macrophage lysosomes following cell incubation with oxidized low density lipoprotein. J. Lipid Res. 1994, 35 (4): 803 — 819.
13. Moog C., Waltzinger C., Luu B., Bischoff P. Studies on the immunological properties of oxysterols: *in vivo* action of 7,25-dihydroxycholesterol upon murine peritoneal cells. Immunology. 1990, 70 (2): 344 — 350.
14. Ohlsoon B.G., Englung M.C., Karlsson A.L. et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding on nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. J. Clin. Invest. 1996, 98 (1): 78 — 89.
15. Rummage J.A., Leu R.W. Photometric microassay for quantification of macrophage Fc and C3b receptor function. J. Immunol. Meth. 1985, 77 (1) 155 — 163.

Поступила 04.04.01