



№ 2/1 (29), 2010 г.

ВЕСТНИК УРАЛЬСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ

Тематический сборник по аллергологии и иммунологии

Главный редактор:

В.А. Черешнев, академик РАН и РАМН (г. Екатеринбург)

Заместители главного редактора:

В.Г. Климин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.М. Кутепов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

Б.Г. Юшков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

Ответственный секретарь:

С.Л. Леонтьев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

Редакционная коллегия:

Н.А. Агаджанян, академик РАМН (г. Москва); Ф.И. Бадаев, д.м.н. (г. Екатеринбург);

А.Б. Блохин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); В.Н. Большаков, академик РАН (г. Екатеринбург);

О.В. Бухарин, член-корреспондент РАН, академик РАМН (г. Оренбург);

А.М. Дыгай, академик РАМН (г. Томск); В.Н. Журавлев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

Н.В. Зайцева, член-корреспондент РАМН (г. Пермь); Ю.М. Захаров, академик РАМН (г. Челябинск);

О.П. Ковтун, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); М.И. Прудков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

К.В. Судаков, академик РАМН (г. Москва); Р.М. Хаитов, академик РАМН (г. Москва);

М.В. Черешнева, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

В.И. Шевцов, член-корреспондент РАМН (г. Курган);

А.П. Ястребов, член-корреспондент РАМН (г. Екатеринбург)

Редакционный совет:

Я.Б. Бейкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.А. Белкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

С.А. Берзин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Ф.Х. Камилов, д.м.н., профессор (г. Уфа);

Б.А. Кацнельсон, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Л.А. Ковальчук, д.б.н. (г. Екатеринбург);

С.А. Коротких, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.И. Кузьмин, к.м.н., доцент (г. Екатеринбург);

С.В. Кузьмин, д.м.н. (г. Екатеринбург); Л.П. Ларионов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);

Г.И. Ронь, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

УДК 612.017.1(045)

Фомина К.В., Цыпленкова С.В., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ НАТИВНЫМИ ЛИПОПРОТЕИНАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

ГОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

Резюме. Существующие сегодня факты не вызывают сомнения, что аутоиммунные реакции играют ключевую роль в патогенезе атеросклероза. Обсуждаются различные аутоантигены в качестве мишени таких реакций, в том числе и окисленные липопротеины низкой плотности (оЛПНП). Однако данные о связи между уровнем аутоантител к оЛПНП и развитием атеросклероза противоречивы. В данной работе проверяли гипотезу о том, что вызванная введением человеческих нЛПНП аутоиммунная реакция против нЛПНП у крыс вызовет изменения в обмене ЛПНП. Крыс иммунизировали нЛПНП человека в полном адьюванте Фрейнда. Определяли уровень ОХ, хЛПНП, хЛПВП и антител к нЛПНП человека, коэффициент атерогенности. По сравнению с контролем у экспериментальных животных наблюдалось увеличение уровня антител в крови к нЛПНП человека и значимые изменения уровня холестерина липопротеинов, коэффициента атерогенности. Полученные факты указывают на возможность индукции аутоиммунной реакции против нЛПНП у крыс иммунизацией гетерологичными нЛПНП, которая, в свою очередь, служит причиной изменения уровня липопротеинов.

Ключевые слова. Патогенез атеросклероза, аутоиммунные реакции.

В последнее десятилетие было получено достаточно данных в пользу того, что аутоиммунный механизм может являться первичным патогенетическим звеном в развитии атеросклероза. Преимущественной мишенью аутоиммунных реакций рассматриваются модифицированные (окисленные) ЛПНП (оЛПНП). Однако данные о связи между уровнем аутоантител к оЛПНП и атеросклерозом весьма противоречивы [3]. Кроме того, известно, что свободнорадикальное окисление (СРО) является нормальным процессом, протекающим в организме. СРО могут подвергаться не только ЛПНП, но и другие аутоантигены. Гипотеза о модификации ЛПНП как причине атеросклероза не отвечает на вопрос, почему СРО не вызывает развития других аутоиммунных реакций, а рассматривается применительно к атеросклерозу. Существующие противоречия ставят под сомнение идею о модификации ЛПНП и образовании аутоантител к окисленным ЛПНП как о преимущественном механизме индукции и развития атеросклероза. В то же время известны факты существования в норме аутоантител к нативным ЛПНП (нЛПНП), уровень которых при атеросклерозе существенно выше [2]. В наших предыдущих исследованиях также был обнаружен более высокий уровень аутоантител к нЛПНП у людей, больных атеросклерозом, по сравнению со здоровыми, тогда как уровень аутоантител к оЛПНП у больных людей был ниже, чем у здоровых [1].

Гипотеза исследования. Если повышение уровня образования естественных аутоантител к нЛПНП является причиной развития атеросклероза, тогда индукция иммунного ответа против нЛПНП должна вызывать изменение в обмене липопротеинов и приводить к развитию атеросклероза. Изменение обмена липопротеинов у больных атеросклерозом является одним из основных признаков развития заболевания.

Для проверки гипотезы крыс Wistar иммунизировали нЛПНП человека (Sigma) в дозе 200 мкг с ПАФ, содержащем 0,5 мг/мл. Контрольных крыс иммунизировали ПАФ. Известно, что аутоиммунные реакции могут быть вызваны введением гетерологичных антигенов, имеющих сходные антигенные детерминанты. Поэтому мы использовали нЛПНП человека для индукции аутоиммунной реакции против нЛПНП у крыс. Ежедневно определяли уровень антител к нЛПНП человека методом ИФА, уровень общего хо-

лестерина (ОХ), холестерина ЛПНП (хЛПНП), холестерина ЛПВП (хЛПВП), рассчитывали коэффициент атерогенности (КА).

В ответ на иммунизацию нЛПНП человека у крыс повышался уровень антител против нЛПНП человека с максимумом образования на 21 день после иммунизации с дальнейшим выходом на плато. На 10 день после иммунизации наблюдалось увеличение уровня ОХ, хЛПНП, хЛПВП. На 14 день отмечено максимальное значение коэффициента атерогенности. У животных, иммунизированных только ПАФ, спустя 10 дней после иммунизации наблюдалось медленное и незначительное снижение ОХ, хЛПНП и хЛПВП. При этом значение КА практически не изменялось. Антитела к нЛПНП человека выявлены не были. Кроме того, обнаружено, что ЛПНП человека при хранении теряли способность вызывать образование антител при иммунизации. Таким образом, иммунизация крыс нЛПНП человека в ПАФ, привела к повышению уровня антител против нЛПНП человека, изменению уровня хЛПНП, хЛПВП, ОХ, и КА по сравнению с контрольными животными. Данные факты указывают на то, что введение гетерологичных (человеческих) нЛПНП может индуцировать аутоиммунную реакцию на аутологичные нЛПНП, которая, в свою очередь, вызывает изменения в обмене липопротеинов.

Работа поддержана грантом № 2.1.1/2157 аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010)».

ЛИТЕРАТУРА

1. Меньшиков И.В., Макарова М.И., Булатова Н.И., Бедулева Л.В., Абишева Н.Н., Поздеева М.Г., Сиднева Н.А., Санникова А.А., Обухова Е.В. Аутоиммунные реакции в патогенезе атеросклероза // Иммунология. 2010. № 2.
2. Хлюстов В. Н. Аутоиммунные механизмы в патогенезе атеросклероза // Успехи современного естествознания. 2007. №12. С. 66.
3. Gounopoulos P., Merki E., Hansen L.F., Choi S.H., Tsimikas S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease // Minerva Cardioangiol. 2007. V.55, № 6. P821-837.

Fomina K.V., Tsyplenkova S.V., Beduleva L.V.,
Menshikov I.V.

CHANGE OF LIPOPROTEINS LEVEL IN BLOOD OF RATS IMMUNIZED HETEROLOGOUS NATIVE LDL

Udmurt State University, Izhevsk

Summary. The existing facts to be beyond doubt, that autoimmune reactions play a key role in pathogenesis of atherosclerosis. Various autoantigens such as a oxidized low-density lipoproteins (oLDL) are discussed as a target of autoimmune reactions. However, data about connection between oLDL and development of an atherosclerosis are inconsistent.

The hypothesis of this research is autoimmune reaction to native LDL (nLDL) caused by injection heterologous nLDL can lead to change in a lipoprotein exchange. Rats were immunized humans nLDL with complete Freund's adjuvant. Levels of total cholesterol, cholesterol of LDL, cholesterol of HDL and antibodies to heterologous nLDL were

measured. In addition atherogenic index was calculated. The increase in a level of antibodies in blood to heterologous nLDL and significant changes in a level of lipoproteins at experimental animals was observed

in comparison with control rats. These results reveal the possibility to induce autoimmune reaction to nLDL at rats by injection heterologous nLDL which caused of lipoproteins level change.

УДК [(612.017.1 : 576.3) : (615.37 : 615.214.2)] : 159.929

Фомичева М.А., Рябичева Т.Г.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК, ОБРАБОТАННЫХ НЕЙРОЛЕПТИКОМ

УРАМН НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, ЗАО "Вектор-Бест", г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящем исследовании показано, что снижение параметров моторного и исследовательского компонентов ориентировочно-исследовательского поведения мышей (СВА х С57Bl/6)F1 в тесте "открытое поле" после трансплантации им иммунокомпетентных клеток, прекультивированных с аминазином, сопровождается определенным изменением продукции клетками головного мозга ряда цитокинов, что может являться одним из механизмов нейролептического эффекта указанных клеток.

Ключевые слова. Нервная и иммунная системы, ориентировочно-исследовательское поведение мышей.

Известно, что нервная и иммунная системы тесно взаимодействуют в процессе своего функционирования. При изучении афферентного звена указанного взаимодействия нами впервые была продемонстрирована возможность направленного изменения параметров ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) мышей (СВАхС57Bl/6)F1 трансплантацией иммунокомпетентных клеток [1]. При исследовании механизмов выявленного феномена, было установлено, что иммунокомпетентные клетки мышей с различным уровнем ОИП достоверно различаются по своей функциональной активности [3, 4, 5]; в связи с чем была предпринята попытка соответствующим образом изменить активность клеток селезенки животных экстракорпорально, путем их обработки *in vitro* нейролептиком фенотиазинового ряда - аминазином, с последующей трансплантацией мышам - реципиентам. Предпринятая попытка увенчалась успехом: у реципиентов был получен нейролептический эффект, проявившийся в изменении параметров их поведения [6, 7].

С целью установления механизмов нейролептического эффекта, полученного путем трансплантации иммунокомпетентных клеток, функциональная активность которых была изменена предварительной обработкой аминазином, в настоящем исследовании проводилось изучение продукции регуляторных цитокинов клетками головного мозга мышей-реципиентов.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах-самцах (СВАхС57Bl/6)F1 в возрасте трех месяцев. Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2-х недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Все эксперименты проводились в период времени с 10 до 14 часов.

Параметры ОИП мышей оценивали в тесте "открытое поле" [2]. По характеру поведения в "открытом поле" мыши (СВА х С57Bl/6)F1 достоверно разделяются на три группы: с высоким, средним и низким уровнем ОИП [5, 9]. Учитывая специфический эффект аминазина, в дальнейших экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались исключительно животные с высоким уровнем ОИП.

Спленоциты мышей-доноров обрабатывали *in vitro* аминазином из расчета 15×10^6 клеток / 150 мкг аминазина в присутствии 3% FCS в течение 25 минут. Концентрация препарата, применяемая для обработки клеток, определялась путем перерасчета терапевтической дозы, с учетом веса и особенностей метаболизма животных. Затем, после 3-кратного отмывания, прекультивированные с аминазином спленоциты внутривенно вводили сингенным мышам-реципиентам в концентрации 15×10^6 клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия аминазина.

У мышей-реципиентов определялись параметры ориентировочно-исследовательского поведения и количественное содержание цитоки-

нов в лизатах клеток головного мозга.

Лизаты головного мозга животных получали путем гомогенизации тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0,1% Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH), с последующим центрифугированием в течение 3 минут при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для исследования.

Содержание цитокинов в исследуемых образцах оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием специфических компонентов к цитокинам мыши производства фирмы "R&D Systems" (Великобритания). Принцип анализа «sandwich» – вариант твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа на планшетах (моноклональные антитела на подложке, конъюгат поликлональных антител с биотином) по технологии, разработанной в ЗАО "Вектор-Бест" для определения цитокинов. Чувствительность наборов для ИЛ-1β и ИЛ-4 не превышает 5 пг/мл, для ИЛ-6 и ИФНγ-2 пг/мл, для ФНОα-1 пг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы "Statistica 6.0".

Результаты исследования

Нами показано, что культивирование спленоцитов с аминазином изменяет их функциональную активность, проявляющуюся в снижении спонтанной пролиферативной активности ($628,9 \pm 204$ имп/мин и $144,0 \pm 47,6$ имп/мин в контрольной и опытной группах соответственно; $p < 0,05$). Трансплантация указанных клеток мышам-реципиентам вызывает у последних изменение моторного и исследовательского компонентов ОИП, выражающееся в достоверном снижении параметров горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте "открытое поле" [6, 7]. При этом отмечается изменение продукции клетками головного мозга ряда провоспалительных цитокинов (табл.), участвующих в модуляции поведенческих реакций [3, 4, 8].

Таблица 1

Содержание цитокинов в лизатах клеток головного мозга мышей после трансплантации им спленоцитов, прекультивированных с аминазином ($M \pm SD$)

Группы животных - реципиентов	Содержания цитокинов (пг/мл)		
	ИЛ-1β	ИЛ-6	ФНОα
Контрольная группа (n = 12)	82,7 ± 37,0	688,5 ± 101,8	152,5 ± 25,3
Опытная группа (n = 12)	135,4 ± 22,3*	976,7 ± 117,6*	202,9 ± 46,7*

Примечание: * - $p < 0,01$ между контрольной и опытной группами животных.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что снижение параметров ОИП у мышей после трансплантации спленоцитов, обработанных аминазином, сопровождается изменением продукции клетками головного мозга ряда регуляторных цитокинов. Изменение цитокинового фона ЦНС может, по нашему мнению, являться одним из механизмов продемонстрированного нейролептического эффекта трансплантированных иммунокомпетентных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов В.В., Маркова Е.В., Короткова Н.А., Козлов В.А. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2002. Т.134, № 9. С.319-321.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991.
3. Маркова Е.В. Абрамов В.В., Козлов В.А. // Успехи современной биологии, 2009. Т.129, № 4. С.348-355.
4. Маркова Е.В. Абрамов В.В., Козлов В.А. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2009. Т.147, № 4. С.435-441.