

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИПИДНЫХ И ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ

Лобанова Е.Г., Караман Ю.К.

Владивостокский филиал Учреждения РАМН Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток

Резюме. Установлено, что формирование липидных нарушений у крыс сопровождается повышением уровня фактора некроза опухоли альфа (TNF α) в крови и печени, снижением индекса активности цитокиновой регуляции, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса на органном и системном уровнях, истощении резервного потенциала и адекватного реагирования иммунокомпетентных клеток. Интенсивность секреции TNF α зависит от длительности формирования алиментарной дислипидемии у крыс: максимальное количество TNF α в крови и печени выявлено на 30 сутки формирования дислипидемии. На 90 и 180 сутки алиментарной нагрузки происходит постепенное угнетение цитокинпродуцирующей способности клеток иммунной системы. В динамике формирования алиментарной дислипидемии изменяется характер внутри- и межсистемного взаимодействия в сторону увеличения количества коррелируемых признаков липидтранспортной и иммунной систем и силы их интегрирования между собой, нарастания корреляционных взаимосвязей между параметрами липидного обмена в крови и уровнем провоспалительного цитокина в печени.

Ключевые слова: липиды крови, фактор некроза опухоли, алиментарная дислипидемия, корреляционный анализ

Lobanova E.G., Karaman Yu.K.

RELATIONSHIPS BETWEEN LIPID AND IMMUNE DISORDERS AT VARIOUS STAGES OF DEVELOPING EXPERIMENTAL DYSLIPIDEMIA

Abstract. It was found that development of lipid disorders in rats is accompanied by increased levels of tumor necrosis factor alpha (TNF α) in blood and liver, decreased cytokine regulation index, thus suggesting arising inflammatory reaction at the organ and systemic levels, exhaustion of functional reserve and diminished response of immunocompetent cells. Intensity of TNF α secretion depends on the duration of emerging alimentary dyslipidemia in rats, i.e., maximal amounts of TNF α in blood and liver were detected at day 30 of evolving dyslipidemia. At 90th and 180th day after starting the alimentary load, a gradual inhibition of cytokine-producing ability by immune cells is observed. In the course of evolving alimentary dyslipidemia, the patterns of intra- and inter-systemic interactions are altered towards increased correlations between lipid transport and immune markers, as well as higher intercorrelations between the parameters of blood lipid metabolism and proinflammatory cytokine levels in the liver. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 61-66)

Keywords: blood lipids, tumor necrosis factor, alimentary dyslipidemia, correlation analysis

Адрес для переписки:

Лобанова Елена Григорьевна
690105, г. Владивосток – 105, ул. Русская, 73 «г».
Тел./факс: (4232) 34-55-02.
E-mail: isachenko1@yandex.ru

Введение

В последние годы в литературе широко обсуждается вопрос о роли воспаления в формировании дислипидемии (ДЛП) [1-4]. Общеизвестно,

ной становится точка зрения, что метаболические и иммунные пути регуляции имеют общие точки пересечения [5]. Многие гормоны, цитокины, сигнальные белки и биологически активные липиды могут функционировать как факторы, регулирующие липидный обмен и одновременно иммунный ответ [7, 11]. В этой связи важными являются данные о том, что липидтранспортная и иммунная системы функционально сопряжены и взаиморегулируются многообразными прямыми и обратными связями [8, 17]. Нарушение функционирования какой-либо из систем приводит к изменению общей регуляции физиологических процессов, развитию различных патологических состояний, в том числе ДЛП, иммунодефицита. Несмотря на многочисленные исследования механизмов развития нарушений липидного обмена и иммунного ответа вопрос о функциональном сопряжении и взаиморегуляции иммунных и биохимических реакций изучен недостаточно [15, 16].

Цель исследования: изучить взаимосвязь между интенсивностью образования фактор некроза опухоли альфа (TNF α) в крови и печени у крыс с показателями липидного обмена в динамике развития алиментарной дислипидемии.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой тела $180,5 \pm 10,6$ г. Модель алиментарной ДЛП у крыс вызывали разбалансированным по составу жиров рационом с включением говяжьего сала (19% от общего состава рациона) и холестерина (2% от общего состава рациона) в течение 180 суток [14]. Все животные были рандомизированы на шесть групп по 10 крыс в каждой: опытные группы – животные, содержавшиеся на экспериментальном рационе (30 суток – опытная группа 1; 90 суток – опытная группа 2; 180 суток – опытная группа 3); контрольные группы крыс, находившиеся на стандартном рационе вивария (30 суток – контрольная группа 1; 90 суток – контрольная группа 2; 180 суток – контрольная группа 3). Эвтаназию животных проводили путем декапитации под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 [13]. Липидный спектр сыворотки крови (общий холестерин – ОХС, триглицериды – ТГ, холестерин липопротеидов высокой плотности – ХС ЛПВП) исследовали на биохимическом анализаторе FR-901 (Финляндия). Рассчитывали концентрацию липопротеидов низкой (ХС ЛПНП), очень

низкой плотности (ХС ЛПОНП) и индекс атерогенности (ИА) [2]. В сыворотке крови и в гомогенате печени иммуноферментным методом определяли уровень провоспалительного цитокина – TNF α (Genzyme diagnostics, Cambridge, MA, USA, DuoSet system). Клетки крови и гомогенат печени индуцировали липополисахаридом (LPS) *Escherichia coli* (Sigma, MO, USA; серотип 055:B5) в дозе 10 мкг/мл. Рассчитывали индекс активности цитокиновой регуляции (ИАЦР) как соотношение уровня индуцированного синтеза цитокинов (стимулированного липополисахаридом (ЛПС (+) *E. coli*) к спонтанному (нестимулированному липополисахаридом (ЛПС (-) *E. coli*) по авторской модификации Е.Г. Лобановой (Исаченко) [6]. Статистическую обработку данных проводили с использованием методов описательной статистики и метода корреляционного анализа. Статистическую значимость различий средних величин определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Развитие модели ДЛП сопровождалось изменением липидного спектра сыворотки крови крыс относительно контрольной группы (табл. 1). У крыс опытной группы 1 установлено достоверное увеличение ОХС, ТГ, ХС ЛПОНП. При этом ХС ЛПВП снижался более чем в 2 раза, а индекс атерогенности крови увеличился на порядок. Во 2-ой опытной группе крыс выявлено снижение концентрации ТГ и ХС ЛПОНП по сравнению с контрольной группой 2, в то время как ХС ЛПНП напротив повысился на 45% ($p < 0,01$). Индекс атерогенности в данной группе животных был самым низким (табл. 1). Воздействие на крыс гиперкалорийным рационом до 180 суток сопровождалось усилением гиперлипидемии по сравнению с менее продолжительной алиментарной нагрузкой (90 суток). Отмечено достоверное повышение ОХС, ТГ и индекса атерогенности относительно значений контрольной группы 3. Обнаружены низкие значения ХС ЛПОНП, как и у крыс опытной группы 2.

Развитие ДЛП в течение 30 суток сопровождалось увеличением уровня TNF α в сыворотке крови в 27 раз ($p < 0,001$), в печени – в 33 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой 1 (табл. 2). Выявленная гиперцитокинемия в крови и печени при краткосрочной диетиндуцированной ДЛП свидетельствует о формировании острой воспалительной реакции на органном (печень) и системном уровнях. При этом реактивная способность иммунокомпетентных

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У КРЫС С ДЛП, М±m

Показатели, ммоль/л	Группы, n = 10					
	Контрольная 1	Опытная 1	Контрольная 2	Опытная 2	Контрольная 3	Опытная 3
ОХС	1,57±0,04	3,34±0,04***	1,67±0,05	1,68±0,08	1,62±0,05	2,04±0,17*
ТГ	1,12±0,04	1,95±0,06***	1,62±0,40	0,51±0,05***	0,79±0,09	***1,17±0,08*
ХС ЛПВП	0,67±0,04	0,26±0,02***	0,40±0,08	0,50±0,08	0,70±0,05	0,5±0,15
ХС ЛПНП	0,7±0,16	0,84±0,196	0,53±0,12	0,96±0,12*	0,78±0,08	0,9±0,06
ХС ЛПОНП	0,65±0,19	1,14±0,29*	0,73±0,18	0,23±0,02**	0,56±0,04	0,20±0,03***
ИА, у.е.	1,43±0,15	11,87±1,55***	3,41±0,71	2,46±0,35	3,22±0,11	***7,4±0,8***

Примечание. * справа – статистическая значимость различий относительно контрольной группы, слева – относительно опытной группы 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

клеток (ИКК), определяемая по ИАЦР, у крыс опытной группы 1 была снижена в 2 раза. Низкий уровень ИАЦР указывает на истощение резерва иммунной реактивности ИКК при последующей атаке чужеродным агентом.

Для установления коммуникаторных взаимосвязей липидтранспортной и иммунной систем при формировании ДЛП проведен корреляционный анализ между уровнем TNF α в печени и сыворотке крови и показателями липидов крови.

У крыс контрольных групп отсутствовали достоверные корреляционные связи между параметрами липидного обмена и уровнем TNF α (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях физиологического состояния иммунные и биохимические процессы протекают с минимальной степенью сопряжения.

У крыс опытной группы 1 найдены тесные корреляционные связи между показателями TNF α в крови и ОХС ($r = -0,68$), ХС ЛПВП ($r = 0,66$), ИА ($r = -0,88$); между TNF α в печени и ТГ ($r = 0,65$), ХС ЛПВП ($r = -0,59$), ХС ЛПОНП ($r = -0,52$). Данные взаимосвязи обусловлены тем, что с одной стороны, экзогенные липиды и их метаболиты в качестве антигенов оказывают иммуностимулирующее влияние на ИКК, вырабатывающие провоспалительные цитокины. С другой стороны, биологически активные молекулы, синтезируемые клетками иммунной системы в процессе активации, участвуют в регуляции липидного обмена путем подавления или стимуляции синтеза жиров [11].

У крыс опытной группы 2 уровень TNF α в сыворотке крови и печени был выше относительно контрольной группы 2 (в 15 и 19 раз соответственно, $p < 0,001$) (табл. 2). Однако отно-

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ TNF α В КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС С ДЛП, М±m

Концентрация TNF α	Группы, n = 10					
	Контрольная 1	Опытная 1	Контрольная 2	Опытная 2	Контрольная 3	Опытная 3
В сыворотке, пг/мл	42,04±3,76	821,65±59,14***	40,19±4,28	639,87±101,52***	41,22±3,04	***217,10±20,11***
В плазме ЛПС (-), пг/мл	62,98±5,63	1598,30±158,81***	61,06±6,12	1137,5±239,67***	63,37±4,71	***265,46±19,70**
В плазме ЛПС (+), пг/мл	225,84±20,20	2807,94±199,98***	218,31±22,61	***1587,5±260,62***	244,18±18,15	***275,90±18,5
ИАЦР, у.е.	3,83±0,18	1,8±0,08***	3,57±0,06	1,55±0,20***	3,85±0,10	1,04±0,02***
В печени, пг/г	252,82±10,47	8379±450,56***	244,22±8,58	***4863,37±472,95***	250,08±9,62	***429,03±31,68**

Примечание. * справа – статистическая значимость различий относительно контрольной группы, слева – опытной группы 2 относительно группы 1, у крыс опытной группы 3 относительно группы 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ЛИПИДАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ И УРОВНЕМ TNF α В КРОВИ И ПЕЧЕНИ КРЫС С ДЛП

Показатели	Группы, n = 10					
	Контрольная 1	Опытная 1	Контрольная 2	Опытная 2	Контрольная 3	Опытная 3
TNF α в сыворотке крови						
ОХС	0,01	-0,68	0,01	0,20	0,01	-0,02
ТГ	-0,18	0,23	-0,18	-0,08	-0,18	-0,02
ХС ЛПВП	0,06	0,66	0,06	0,17	0,06	0,98
ХС ЛПНП	0,02	-0,29	0,02	0,17	0,02	-0,35
ХС ЛПОНП	-0,07	0,36	-0,07	-0,08	-0,07	-0,51
ИА	-0,06	-0,88	-0,06	0,53	-0,06	0,53
TNF α в печени						
ОХС	0,15	-0,28	0,15	0,58	0,15	0,11
ТГ	0,10	0,65	0,10	-0,52	0,10	-0,56
ХС ЛПВП	0,11	-0,59	0,11	0,01	0,11	0,99
ХС ЛПНП	0,19	-0,01	0,19	0,66	0,19	-0,56
ХС ЛПОНП	0,12	-0,52	0,12	-0,52	0,12	-0,84
ИА	-0,02	0,10	-0,02	-0,02	-0,02	0,59

Примечание. Выделен коэффициент корреляции (r) умеренной ($0,5 \leq r \leq 0,7$) и сильной ($r \geq 0,7$) связи.

сительно крыс опытной группы 1 концентрация провоспалительного цитокина в сыворотке крови и печени снизилась (в 1,3 и 2 раза соответственно, $p < 0,001$). Данные изменения свидетельствуют о переходе острой воспалительной реакции, наблюдаемой на начальных этапах развития ДЛП в хроническую форму при пролонгированном течении липидных нарушений (табл. 2). На это же указывает тенденция к снижению ИАЦР.

Проведенный корреляционный анализ у крыс опытной группы 2 выявил положительную связь с уровнем TNF α в крови и ИА ($r = 0,53$). TNF α в печени прямо коррелировал с показателем ОХС ($r = 0,58$), ХС ЛПНП ($r = 0,66$) (табл. 3). Обратные связи обнаружены между концентрацией TNF α в печени и уровнем ТГ ($r = -0,52$), ХС ЛПОНП ($r = -0,52$). Следовательно, при развитии ДЛП на первое место выходит взаимодействие наиболее атерогенного класса липопротеидов – ХС ЛПНП и ОХС с TNF α в крови и печени. В отличие от опытной группы 1, у крыс опытной группы 2 преобладали связи между показателями липидного обмена и уровнем TNF α в печени, что свидетельствует об органной локализации воспалительного процесса. Триггерные свойства TNF α детермини-

ровать метаболические и иммунные нарушения в печени изменяют внутри- и внеклеточный гомеостаз, индуцируют патоморфологическую перестройку структуры органа, запускают процессы фиброгенеза [12, 17].

Длительное воздействие (до 180 суток) на крыс экзогенными атерогенными агентами способствовало дальнейшему снижению уровня сывороточного TNF α по сравнению с животными опытной группы 1 (в 3,8 раза) и опытной группы 2 (в 3 раза) (табл. 2). Вместе с тем концентрация провоспалительного цитокина по сравнению с контрольной группой 3 по-прежнему сохранялась на высоком уровне (в 5 раз выше). Та же закономерность выявлена и в печени. Количество TNF α в печени крыс опытной группы 3 превышало значения контрольной группы 3 в 2 раза. Однако по сравнению с животными опытных групп 1 и 2 уровень TNF α в печени был значительно снижен. Выявлен низкий ответ ИКК синтезом TNF α у крыс опытной группы 3 на стимуляцию ЛПС ($p < 0,001$), что свидетельствует об истощении резервных возможностей ИКК при длительном воздействии патогенного фактора и развитии иммунодефицита.

Корреляционный анализ показал прямую зависимость между TNF α и ХС ЛПВП

($r = 0,98$), ИА ($r = 0,53$) и обратную связь между концентрацией TNF α в крови и ХС ЛПОНП ($r = -0,51$) (табл. 3). Максимальные коэффициенты корреляции обнаруживались между содержанием ХС ЛПВП в крови и уровнем TNF α в печени ($r = 0,99$). В опытных группах крыс 1 и 2 эти связи были менее сильными. Прослеживались однонаправленные отрицательные корреляционные взаимоотношения между уровнями ТГ, ХС ЛПНП в крови и TNF α в печени ($r = -0,56$), а также между концентрацией ХС ЛПОНП в сыворотке крови и TNF α в печени ($r = -0,84$). Выявлена связь относительно содержания TNF α в печени и индексом атерогенности ($r = 0,59$).

Анализ полученных результатов позволил выявить взаимосвязь липидных и иммунных нарушений на разных этапах развития экспериментальной дислипидемии. Максимальный уровень TNF α в крови и печени обнаружен на 30 сутки формирования ДЛП. Длительное воздействие высокожирового рациона истощает реактивность ИКК, что подтверждается снижением синтеза провоспалительного цитокина. При этом показано, что в динамике формирования алиментарной дислипидемии изменяется характер внутри- и межсистемного взаимодействия в сторону увеличения количества коррелируемых признаков липидтранспортной и иммунной систем и силы их интегрирования между собой. Таким образом, одним из ведущих механизмов нарушения функциональной активности ИКК может быть избыточное поступление холестерина в мембрану, что приводит к понижению ее жидкостных свойств, изменению проницаемости и метаболической активности в целом, нарушению функционирования рецепторов [9, 10]. Следовательно, длительное формирование липидных нарушений сопровождается снижением выработки TNF α и истощением резервных возможностей ИКК, что может способствовать развитию аутоиммунных процессов и аутоиммунному поражению органов [1, 7].

Список литературы

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А., Соломатина Л.В., Зубова Т.Э. Варианты развития хронического системного воспаления // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 131-140.

2. Доценко Э.А., Юпатов Г.И., Чиркин А.А. Холестерин и липопротеины низкой плотности как эндогенные иммуномодуляторы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2001. – № 3. – С. 6-15.

3. Доценко Э.А., Юпатов Г.И., Новиков Д.К., Чиркин А.А. Холестерин сыворотки крови и состояние системы иммунитета // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2002. – № 6. – С. 99-105.

4. Душкин М.И., Кудинова Е.Н., Шварц Я.Ш. Интеграция сигнальных путей регуляции липидного обмена и воспалительного ответа // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 18-25.

5. Ешану В.С. Цитокины и их биологические эффекты при некоторых болезнях печени // Клинич. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – № 5. – С. 11-16.

6. Исаченко Е.Г. Способ оценки резервных возможностей иммунокомпетентных клеток для прогноза развития аллергопатологий // Аллергология. – 2006. – № 2. – С. 44-47.

7. Маммаев С.Н., Багомедова Н.В., Богомолов П.О., Мажидов А.И., Абакарова Г.Г., Халимова З.А. Цитокиновая система при неалкогольном стеатогепатите // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17, № 4. – С. 35-39.

8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 553 с.

9. Огурцов Р.П., Пигаревский П.В., Сергеева Е.П., Пузырева В.П., Кузнецова С.А., Попов В.Г. Особенности синтеза фактора некроза опухоли в условиях гиперлипидемии // Иммунология. – 1998. – № 6. – 20 с.

10. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. – 2001. – № 5. – С. 4-7.

11. Юпатов Н.С., Доценко Э.А., Путилина Т.А. Взаимосвязь иммунной и липидтранспортной систем организма // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 1999. – № 1. – С. 38-42.

12. Ding W.X., Yin X.M. Dissection of the multiple mechanism of TNF- α -induced apoptosis in liver injury // J. Cell Mol. Med. – 2004. – Vol. 8, N 4. – P. 445-454.

13. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental

and other scientific purposes. – Strasburg: Council of Europe, 1986. – 51 p.

14. Fan J. Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // World J. of Gastroenterology. – 2003. – Vol. 9, N 9. – P. 2045-2049.

15. Robertson A.-K.L., Zhou X., Strandvik B., Hansson G.K. Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen // Scand. J. Immunol. – 2004. – Vol. 59, N 3. – P. 285-293.

16. Weiner D.E., Sarnak M.J. Managing dyslipidemia in chronic kidney disease // J. General Intern. Med. – 2004. – Vol. 19, N 10. – P. 1045-1052.

17. Wymann M.P., Schreiber R. Lipid signaling in disease // Nature. – 2008. – Vol. 9. – P. 162-176.

поступила в редакцию 02.08.2010

отправлена на доработку 28.08.2010

принята к печати 05.10.2010