

11. Koistinaho J., Honkaniemi J., Sorvaniemi M. et al. The effect of Bleaching on the lipopigments of human sympathetic neurons // Arch. Biol. (Bruxelles).—1985.—96.—P. 362.
12. Montfoort A., Bezstarosty K., Groh M. M., Koster J. F. The influence of the chain length of aldehydes on the fluorescence of chromolipids // FEBS Lett.—1987.—226, N 1.—P. 101—104.
13. Nandy K. Neuronal lipofuscin and its significance // Geriatrics.—1982.—N 1.—P. 257—262.
14. Nandy K. Effects of antioxidants on neuronal lipofuscin pigment // Free Radic. Mol. Biol. Aging and Disease Meet. (New York, Oct. 6—8, 1983).—New York, 1987.—P. 223—233.
15. Sklan D., Budowski P. Simple separation of vitamins D from sterols and retinol by argentation thin-layer chromatography // Anal. Chem.—1973.—49, N 1.—P. 200—201.
16. Sushil J. K. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes // Biochim. et biophys. acta: Biomembranes.—1988.—937(M155), N 2.—P. 205—210.
17. Tappel A. L. Protection against free radical lipid peroxidation reactions // Pharmacological Intervention Aging Process.—Nev. York, 1978.—97.—P. 111—131.

Харьков. ун-т им. А. М. Горького

Материал поступил в редакцию 29.10.88

М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

УДК 616.13—004.6—092.4/9:616.097—078

И. М. Ганджа, И. П. Мякая, Э. В. Гюллинг, А. Ф. Федотов,
Г. И. Корут, К. М. Шатрова

Взаимосвязь атерогенеза и Т-иммунодефицита

Данные экспериментальных и клинико-иммунологических исследований свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи атерогенеза, функционального состояния иммунной системы и неспецифических факторов защиты организма. Установлено, что в условиях экспериментальной нагрузки холестерином атерогенез может быть существенно ослаблен разнообразными воздействиями на иммунную систему. О существенном значении функционального состояния иммунной системы в атерогенезе косвенно свидетельствует увеличение содержания в крови тимэктомированных животных общего холестерина и бета-липопротеидов [1, 5]. При холестериновой нагрузке у них развивается более выраженная гиперхолестеринемия, чем у контрольных животных. Результаты этих экспериментов согласуются с клиническими наблюдениями развития гиперхолестеринемии у людей с Т-иммунологической недостаточностью, в том числе и у больных, лечившихся иммуносупрессивными препаратами. В свою очередь, у больных атеросклерозом, как правило, обнаруживалась достоверная недостаточность Т-звена иммунной системы, проявляющаяся в уменьшении содержания в периферической крови сывороточного тимического фактора, Е-розеткообразующих лимфоцитов, снижении их чувствительности к ФГА и различным дифференцировочным факторам, а также в снижении супрессорной активности [2, 4, 7, 8].

Разнообразные изменения иммуноцитов, наблюдаемые при экспериментальной гиперлипидемии: угнетение иммунного ответа на тимус-зависимые антигены, подавление гиперчувствительности замедленного типа и реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), достоверное угнетение активности Т-супрессоров [9] — свидетельствуют об иммуносупрессорной активности липидов. Следствием иммунодефицита в этих условиях может явиться избыточное образование аутоантител к липопротеидам и антигенам сосудистой стенки, способствующее развитию атеросклероза. Вопрос о причинно-следственных взаимоотношениях гиперлипидемии, изменений функционального состояния системы иммунитета и атерогенеза остается не выясненным.

Цель нашей работы — дальнейшее экспериментальное изучение этого важного аспекта проблемы атеросклероза.

Методика

На кроликах-самцах (71 животное) массой 2,0—3,0 кг проведено четыре серии опытов. Атеросклероз у этих животных моделировали пероральным введением в течение 2 мес 2 %-ной взвеси холестерина (0,2 г/кг) в подсолнечном масле. До, в процессе и перед окончанием экспериментов проводили комплекс биохимических и иммунологических исследований. Содержание холестерина в сыворотке крови, содержание триглицеридов, пребета- и бета-липопротеидов изучали с помощью общепринятых методов. Состояние Т-звена иммунной системы оценивали по РБТЛ периферической крови на ФГА и Кон А и результатам исследования супрессорной активности периферической крови, индуцированной Кон А.

Выраженность атеросклеротического поражения аорты оценивали с помощью метода планиметрии по Автандилову, а также при микроскопическом исследовании ее срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, суданом черным В, фукселином по методам Вейгерта, Ван-Гизона и после импрегнации серебром по методу Фута.

В I серии опытов изучали влияние на атерогенез Т-иммунной недостаточности, индуцированной латентной вирусной инфекцией. Использовали вирус простого герпеса I типа (штамм Л-2), полученный из Института вирусологии им. Д. И. Иванковского АМН СССР. Латентную герпетическую инфекцию моделировали следующим образом: в центральной зоне роговицы 10 кроликов (1-я группа) острой иглой делали несколько поверхностных царапин. На поврежденный участок наносили 0,1 мл вируссодержащего материала 10-ТЦД/50. Спустя 4—5 сут в месте инфицирования развивался кератоконъюнктивит. Через 2 нед., т. е. после исчезновения признаков заболевания, кроликов переводили на атерогенный рацион.

При планировании II серии экспериментов в основу рабочей гипотезы был положен известный факт об угнетении Т-звена иммунной системы при старении. Была предпринята попытка восстановить утраченные функции введением молодых аутологичных клеток, взятых из костного мозга. У молодых кроликов в возрасте одного года при пункции бедренной кости извлекали костный мозг, который консервировали и хранили в жидком азоте при температуре -196°C . Через два года, когда кролики состарились, части из них был ретрансплантирован их же собственный костный мозг ($2,6 \cdot 10^8$ ядерных клеток/кг). Для оценки морфофункциональных свойств размороженных миелокарицитов использовали метод Шрека и люминисцентную микроскопию. Неповрежденные клетки составили 89 %. Через 2 нед после операции опытным и контрольным животным скармливали холестерин.

Задачей III серии экспериментов было выяснить, действием каких костномозговых клеток, миелоидного или эритроидного ряда, обусловлены результаты, полученные в предыдущей серии. Клетки эритроидного ряда — гемопоэтические клетки фетальной печени кролика — выделяли из плодов 24—26-суточного возраста, замораживали в «Криозлектронике-11» при температуре -85 — -90°C в течение 24 мес. После размораживания в 1 %-ном растворе эозина окрасилось 12 % клеток при наличии 75 % флюоресцирующих элементов, что указывало на их хорошую сохранность. Трансплантацию гемопоэтических клеток ($5 \cdot 10^7$ миелокарицитов/кг) осуществляли внутрикостно. Через 2 нед животных переводили на атерогенный рацион.

Задача IV серии — изучение влияния на атерогенез активации функций тимусзависимой системы иммунитета неполипептидным тимическим препаратом вилозеном. Иммуномодулятор (2 мг/кг — 5 животных или 0,2 мг/кг — 6 животных) вводили кроликам, получавшим атерогенный рацион, в течение всего эксперимента подкожно.

Контрольные кролики получали только атерогенный рацион. Результаты обработаны с помощью статистических непараметрических методов.

Результаты

Алиментарная нагрузка холестерином вызывала у контрольных животных развитие гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии, сочетавшихся со снижением индуцированной Кон А супрессорной активности Т-лимфоцитов на 23 % по сравнению с исходной, независимо от митогена. Способность к реакции бласттрансформации Т-клеток периферической крови и на Кон А, и ФГА также снижалась нерезко, но достоверно.

У инфицированных вирусом герпеса животных содержание холе-

стерина в крови снижалось без изменения его в группе контрольных животных от $(2,45 \pm 0,2)$ до $(1,7 \pm 0,4)$ ммоль/л ($P_T < 0,05$). В содержании триглицеридов существенные изменения при этом не обнаружены. При нагрузке холестерином гиперхолестеринемия в этой группе животных была ниже, чем в контрольной ($P < 0,1$). Вирусная инфекция не привела к изменениям способности Т-лимфоцитов трансформироваться в бласты ни под воздействием Кон А, ни ФГА. Однако при переводе животных на атерогенный рацион значения показателей РБТЛ на Кон А и ФГА достоверно снижались ($P_T < 0,05$). Заражение животных вирусом герпеса сопровождалось снижением супрессорной активности лимфоцитов периферической крови, которая не зависела от митогена. Скармливание холестерина приводило к более выраженному снижению значений изучаемых показателей, достоверно отличавшихся от таковых в контрольной группе. Площадь атеросклеротического поражения аорты животных с латентной вирусной инфекцией на 55 % превышала таковую животных контрольной группы. У инфицированных животных более выраженными были и гистоморфологические проявления атеросклеротического процесса. Участки утолщения интимы у них, в два раза превышавшие таковые в контроле, были представлены гладкими миоцитами, часть из которых имела морфологию типичных липофагов с цитоплазмой, заполненной липидами. В аорте животных закономерно обнаруживали микроочаги «просветления» средней оболочки, которые были лишены клеточных и неклеточных структур и содержали слабую оксифильную гомогенизированную субстанцию. Кроме того, отмечали выраженный периваскулярный склероз по ходу *vasa vasorum* адвентиции.

Двухлетнее содержание кроликов на обычном рационе привело к небольшому недостоверному ($P > 0,05$) снижению количества холестерина и повышению количества триглицеридов. Ретрансплантация костного мозга не вызвала осложнений. Показатели обмена липидов при этом не изменились. При переводе животных на атерогенный рацион значения определяемых показателей были более высокими в группе животных с пересаженными аутологичными клетками костного мозга. Однако атеросклероз у них был выражен намного слабее, чем у животных контрольной группы. У четырех кроликов не наблюдали липоидоза и утолщения интимы. У других четырех животных были выявлены лишь следы общих липидов в незначительных по размеру сегментах интимы без ее утолщения. Их обнаруживали в цитоплазме единичных липофагов и основном веществе в виде узкой полоски по ходу внутренней эластической мембраны. Только у двух животных из десяти отмечены незначительные сегментарные утолщения интимы за счет скопления «пенистых» клеток с общими липидами в цитоплазме. Вне зон утолщения мельчайшие суданфильные включения в виде тончайшей полоски располагались в основном веществе по ходу внутренней эластической мембраны. В зонах отдельных сегментарных утолщений интимы наблюдались признаки оксифильного отека внутренних слоев меди.

В то же время в аорте старых кроликов контрольной группы были обнаружены сегментарные утолщения интимы различной выраженности: от незначительных по длине и толщине до распространяющихся на $2/3$ окружности просвета с максимальной толщиной, достигающей $1/2$ средней оболочки. Особенно четко эти утолщения были выражены в местах отхождений ветвей от аорты. Они были представлены «пенистыми» макрофагами и небольшим количеством клеток типа гистиоцитов и гладкомышечных клеток. В этих участках сосудов во внутренних слоях средней оболочки наблюдались своеобразный «эозинофильный» отек и разволокнение внутренней эластической мембраны. При этом обнаруживались признаки миграции миоцитов из средней оболочки во внутреннюю. При окраске суданом III во всех зонах утолщения интимы отмечалась яркая суданофилия.

В опытах с использованием гомологичных гемопоэтических клеток эритроидного ряда, выделенных из эмбриональной ткани, не обнаружено никаких различий содержания холестерина, триглицеридов, а также значений показателей Т-системы иммунитета и уровня липоидоза аорты по сравнению с таковыми животных контрольной группы.

Введение кроликам небелкового тимического препарата вилозена одновременно со скормливанием холестерина существенно не сказывалось на выраженности гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии, которая была аналогична таковой у животных, получавших лишь атерогенный рацион. Введение вилозена предотвратило ослабление реакции Т-лимфоцитов на Кон А, но не отразилось на их ФГА-трансформации и супрессорной активности.

Развитие атеросклероза у животных, получавших тимический препарат, значительно замедлилось. Площадь поражения аорты составила лишь 37 % таковой животных контрольной группы, а очаговые утолщения интимы были в 3 раза меньшими, чем в контроле.

Обсуждение

Анализ результатов подтверждает справедливость высказанного нами ранее предположения [7] о существенной взаимосвязи изменений функционального состояния клеточных элементов, участвующих в обеспечении иммунитета, и развития атеросклероза. Об этом свидетельствует и тот факт, что экспериментальный атерогенез можно изменить разнообразными воздействиями на систему иммунитета. Так, при вирусной инфекции развитие иммуносупрессии, по нашим результатам и наблюдениям Bursh и соавт. [10], сочетается с усилением атерогенеза. Развитие тяжелого атеросклероза отмечено в пересаженном сердце, взятом от молодого донора, при введении реципиенту иммуносупрессоров [13]. В противоположность этому, коррекция возрастной иммунной недостаточности трансплантацией аутологичного костного мозга, взятого в молодом возрасте, значительно ослабляет развитие алиментарного атеросклероза у кроликов. Угнетение атерогенеза может быть достигнуто также введением животным естественного тимического препарата — вилозена, компенсирующего снижение функциональной активности вилочковой железы, возникающее в условиях экспериментальной гиперлипидемии. Однако тот факт, что при введении вилозена угнетение атерогенеза в условиях алиментарной гиперлипидемии не сочеталось с восстановлением супрессорной активности Т-лимфоцитов, позволяет предположить, что снижение последней не является определяющим в атерогенезе.

По нашему мнению, следует обратить внимание на функции макрофагов, играющих существенную роль в иммунном ответе и липидном обмене. В атерогенезе макрофаги имеют существенное значение. Холестерин не расщепляется макрофагами, а выводится из клетки в составе липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и поступает в печень. При угнетении этого процесса холестерин задерживается в макрофагах. Истощение возможности макрофагов накапливать холестерин приводит к их разрушению и выходу холестерина во внеклеточное пространство [14].

Холестеринемия, по-видимому, в значительной мере связана с функциональным состоянием макрофагов. Как показано [11], при «блокаде» макрофагов коллоидным углем она возрастала, при стимуляции — снижалась. Содержание холестерина в макрофагах, выделенных из аорты кроликов, инъецированных адьювантом Фрейнда перед переводом на атерогенный рацион, было меньшим по сравнению с таковым животных контрольной группы [12].

Известно [6], что захват макрофагами ЛПНП опосредован рецепторами гладкомышечных клеток, макрофагов, фибробластов, расположенных на поверхности клеток. В том случае, если их нет (генетический дефект), развивается гиперлипидемия IIa-типа. Причиной

«блокады» специфических рецепторов могут быть и нарушение питания (избыток холестерина, насыщенных жирных кислот и т. д.). Нарушение рецепторного аппарата может привести к поступлению холестерина в клетку в результате нерегулируемого эндоцитоза и накоплению его там в избыточном количестве.

Сказанное дает основание предположить, что установленное нами усиление атерогенеза в условиях хронической вирусной инфекции является следствием не только нарушения Т-звена иммунитета, но и подавления функций макрофагов вирусами, о чем имеются сообщения в литературе [4]. Вполне вероятно, что трансфузия старым кроликам аутологичных костномозговых клеток затормозила атерогенез в результате действия клеток миелоидного ряда, т. е. моноцитов- и нейтрофилов-макрофагов, поскольку контрольные опыты с клетками эритроидного ряда позволили исключить их влияние на атерогенез. Обнаруженные значительные различия в скоплениях макрофагов во внутренней оболочке аорты кроликов, получавших вилозен, и уменьшение количества липидов в них, косвенно подтверждая их роль в атерогенезе, дают основание объяснить полученные результаты наличием регуляторных механизмов, связывающих Т-систему иммунитета с системой фагоцитирующих макрофагов.

Проведенные исследования, не раскрывая конкретных механизмов связи атерогенеза и функционального состояния системы иммунитета, показывают, что изменением последней можно направленно воздействовать на атерогенез.

Выводы

1. При алиментарной гиперхолестеринемии, а также при латентной вирусной инфекции у кроликов достоверно снижается активность Т-супрессоров периферической крови. У инфицированных животных увеличивается выраженность алиментарного липоидоза аорты.

2. Введение аутологичных костномозговых клеток, взятых у животных в молодом возрасте, снижает выраженность алиментарного липоидоза аорты у старых кроликов.

3. Введение неполипептидного тимического иммуномодулятора вилозена, существенно не влияющее в условиях алиментарной гиперлипидемии на супрессорную активность лимфоцитов, значительно уменьшает выраженность алиментарного липоидоза аорты.

INTERACTION OF ATHEROGENESIS AND T-IMMUNODEFICIENCY

I. M. Gandzha, I. P. Myagkaya, E. V. Gyuling, A. F. Fedotov,
G. I. Kogut, K. M. Shatrova

Experiments on rabbits have shown that state of T-immunodeficiency induced by persisting virus infection promotes atherogenesis. Correction of age immunodeficiency by transplantation of the autologous bone marrow taken in young age considerably retards the atherosclerosis development. Inhibition of atherogenesis is also achieved by introduction (to animals) of natural thymic vilosene preparation which compensates a decrease in the functional activity of the thymus gland occurring under conditions of experimental hyperlipidemia.

Institute of Advanced Training for Doctors,
Ministry of Public Health of the USSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева И. В. Липидный обмен у неонатально тимэктомизированных крыс различного пола // *Вопр. мед. химии.*— 1977.— 23, вып. 4.— С. 440—443.
2. Ганджа И. М. Функциональное состояние Т-клеток супрессоров при атеросклерозе // *Врачеб. дело.*— 1980.— № 4.— С. 61—64.