

УДК 612.018.2:612.017.1

ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЯ ЛЕПТИНА ПРИ ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

© 2015 г. О. В. Зубаткина, *Л. К. Добродеева, А. А. Попов

Северный государственный медицинский университет,

*Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, г. Архангельск

Адипокин лептин, продуцируемый жировой тканью в количестве прямо пропорциональном ее массе, известен прежде всего как регулятор энергетического обмена, контролирующий потребление и расход энергетических ресурсов. Роль лептина становится все более изученной в обеспечении и ряда других физиологических функций, в том числе в функционировании иммунокомпетентных клеток. Определялись показатели иммунного статуса и уровень лептина плазмы крови у 37 практически здоровых волонтеров 22–24-летнего возраста, жителей Архангельска. Все волонтеры регулярно 2–3 раза в неделю занимались спортом, индекс массы тела у них соответствовал норме и находился в интервале 19,5–23,8. Нами изучалась направленность изменений концентрации лептина, содержания иммунокомпетентных клеток и цитокинов в крови. Установлено, что количественные различия в уровне лептина прямо соответствовали изменению концентрации лимфоцитов с рецепторами CD3, CD4, CD8, CD10, CD25, CD71, CD95 и HLADR, в то время как концентрации клеток с рецептором CD23 и IL-4 изменялись противоположно содержанию лептина. Определен однонаправленный характер колебаний концентраций лептина и цитокинов TNF- α и IFN- γ в крови. С использованием метода нормализованного вари-макса была построена трехфакторная модель, которая удовлетворительно описывала связь лептина с фенотипами Т-лимфоцитов, отражая его плеiotропное влияние на Т-клеточную субпопуляцию.

Ключевые слова: лептин, цитокины, лимфоциты, взаимосвязь, адаптивный иммунитет

SIGNIFICANCE OF LEPTIN LEVEL IN ASSESSMENT OF ADAPTIVE IMMUNITY

O. V. Zubatkina, *L. K. Dobrodeeva, A. A. Popov

Northern State Medical University, Arkhangelsk

*Institute of Environmental Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia

Adipokine leptin is produced by the adipose tissue in quantities directly proportional to its mass. It is well known as a regulator of energy exchange, which provides control of energy consumption and expenditures. New information becomes available about its participation in control of some other physiological functions including functioning of immune competent cells.

We have determined parameters of the immune status and concentration of leptin in blood plasma in 37 healthy volunteers aged 22–24 years living in Arkhangelsk. All volunteers had physical activity in gym 2–3 times a week, their body mass index fell in the normal range corresponding to the interval 19.5 – 23.8. We have studied the association of leptin concentration with concentration of immune competent cells and cytokines in blood. It has been found that quantitative differences in the leptin level directly corresponded to the changes of concentration of lymphocytes expressing receptors CD3, CD4, CD8, CD10, CD25, CD71, CD95, HLADR, while the amount of CD23⁺ cells and IL-4 concentration was changed in the opposite way. We have also determined the character of changes in leptin and cytokines TNF- α and IFN- γ concentrations blood. Using the normalized varimax rotation algorithm, we have built a three-factor model that described satisfactorily the association between leptin and T-lymphocytes' phenotypes, constituting its pleiotropic effect on T-cell subsets.

Key words: leptin, cytokines, lymphocytes, interaction, adaptive immunity

Библиографическая ссылка:

Зубаткина О. В., Добродеева Л. К., Попов А. А. Значимость уровня лептина при оценке состояния адаптивного иммунитета // Экология человека. 2015. № 12. С. 16–20.

Zubatkina O. V., Dobrodeeva L. K., Popov A. A. Significance of Leptin Level in Assessment of Adaptive Immunity. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2015, 12, pp. 16–20.

Лептин представляет собой адипокин, который секретируется адипоцитами в количестве, пропорциональном общему объему жировой массы в организме. Лептин обеспечивает увеличение расхода энергии и снижение массы тела, воздействуя на центр насыщения в гипоталамусе. Помимо непосредственного влияния на гипоталамус, контроля энергетического гомеостаза и обеспечения ряда физиологических функций (ангиогенез, репродукция и др.) лептин является возможным медиатором метаболического синдрома, участвует в развитии воспаления, осуществляет взаимосвязь между нутриентным статусом

и иммунокомпетентностью [13]. Рецепторы лептина, принадлежащие к цитокиновым I класса рецепторам, обнаружены у нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и участвуют в реализации тех же сигнальных путей, что и рецепторы цитокинов. Лептин, подобно цитокинам IL-2 и IL-7, увеличивает поверхностную экспрессию Glut 1 и поступление глюкозы в лимфоциты, повышает активность АМР-киназы. По существу, служа метаболитическим регулятором, лептин способствует активации и пролиферации лимфоцитов, стимулирует экспрессию поверхностных клеточных маркеров, активизирует Т-хелперный ответ I типа и

повышет продукцию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IFN- γ и IL-2, IL-6 [3, 11]. В то же время провоспалительные медиаторы, секретируемые клетками иммунной системы, повышают количество рецепторов лептина в иммунокомпетентных клетках. Появляется все больше новых сведений о роли лептина в иммунных взаимодействиях [8]. Изучение влияния лептина на адаптивный иммунитет представляет большой интерес, дополняет знания о физиологических компенсаторных механизмах поддержания состояния здоровья у человека, проживающего в условиях северных широт.

Целью нашего исследования явилось установление направленности изменений между уровнем лептина и содержанием фенотипов Т-клеток, цитокинов в крови здоровых северян.

Методы

Волонтерами были молодые люди 22–24-летнего возраста (37 человек), жители Архангельска, без вредных привычек, регулярно 2–3 раза в неделю занимающиеся спортом (плавание, игровые виды, фитнес, тренажеры). Индекс массы тела у них находился в интервале 19,5–23,8 и соответствовал норме. Все исследования проводились с согласия волонтеров и в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000). На анализ бралась венозная кровь утром натощак, в которой определялись концентрации лептина, IL-4, фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), интерферона гамма (IFN- γ), содержание лимфоцитов и фенотипов Т-клеток CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD23⁺, CD25⁺, CD71⁺, CD95⁺ и HLA-DR. Для определения концентрации цитокинов использовали метод «конкурентного» иммуноферментного анализа тест-наборами BCM Diagnostics фирмы Bio-RAD, CYTIMMUNE sciences INC и CytElisa (США), Dr. Fooke (Германия). Содержание лептина определяли иммуноферментным методом с применением набора фирмы DRG Instruments GmbH (Германия). Статистический анализ результатов исследования проводился в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Вычислялись средние значения определяемых показателей, стандартное отклонение (SD), проводился факторный анализ с применением вращения по методу нормализованного варимакса и строилась факторная модель. Вычерчивались статистические в осях XYZ 3D-графики поверхностей и последовательные наложенные друг на друга 2D-графики, включающие все определяемые случаи.

Результаты

Полученные результаты исследования представлены в таблице, в которой также отражены установленные ранее Добродеевой Л. К. и соавторами [1] пределы физиологических колебаний содержания иммунокомпетентных клеток и цитокинов в крови жителей Архангельской области. Средние значения

определяемых показателей иммунитета находятся в интервалах значений, характерных для здоровых жителей данного региона. Средний уровень лептина составил 1,94 (SD=1,38) нг/мл, что соответствует его референтному диапазону (0,5–13,8 нг/мл).

Средние значения определяемых показателей и пределы их физиологических колебаний в периферической крови у жителей Архангельской области

Показатель	Среднее значение (SD)	Пределы колебаний
Лимфоциты, $\times 10^9$ кл/л	2,53 (0,75)	1,5–4,8
CD3 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,61 (0,18)	0,5–2,0
CD4 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,53 (0,19)	0,4–1,0
CD8 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,48 (0,15)	0,2–0,6
CD10 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,49 (0,18)	0,1–0,8
CD23 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,67 (0,17)	0,2–0,7
CD25 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,61 (0,20)	0,5–1,5
CD71 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,43 (0,17)	0,4–1,0
CD95 ⁺ , $\times 10^9$ кл/л	0,42 (0,17)	0,4–0,8
HLADR, $\times 10^9$ кл/л	0,71 (0,19)	0,5–0,9
IL-4, пг/мл	4,43 (3,01)	1,0–10,0
TNF- α , пг/мл	26,80 (11,24)	5,0–50
IFN- γ , пг/мл	19,78 (1,09)	10–85

Лимфоциты и их фенотипы (за исключением Т-клеток CD23⁺) вошли в построенную с применением вращения по методу нормализованного варимакса трехфакторную модель. В структуре модели компонентами первого фактора стали фенотипы Т-клеток CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD71⁺, CD95⁺, во второй фактор с наибольшим факторным весом вошел лептин, а в третий – клетки с рецептором CD25 и HLA-DR (рис. 1). Четко выделенный однокомпонентный фактор, представленный лептином, оказался связан, с одной стороны, с многокомпонентным фактором, включающим зрелые Т-лимфоциты,

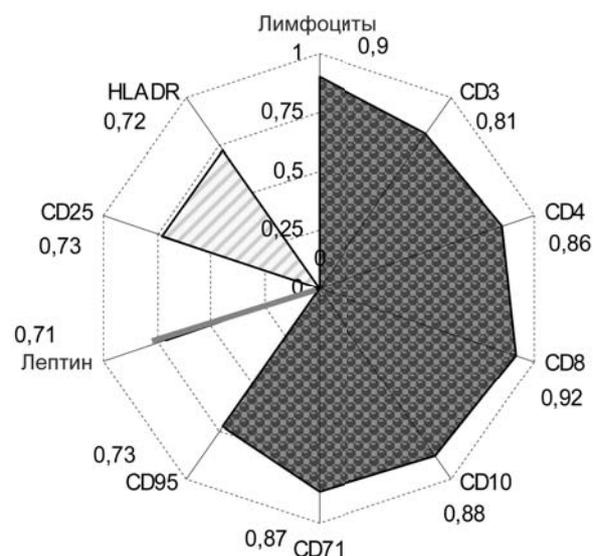


Рис. 1. Структура факторной модели

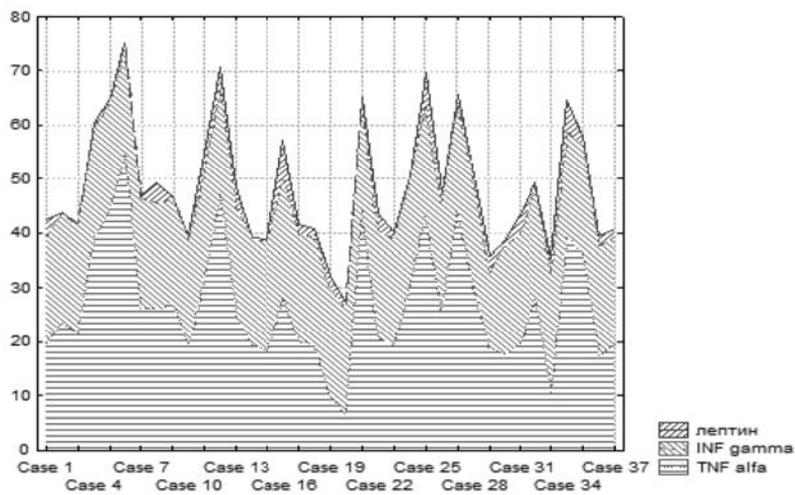


Рис. 2. Флуктуации показателей цитокинов (TNF- α , IFN- γ) и лептина

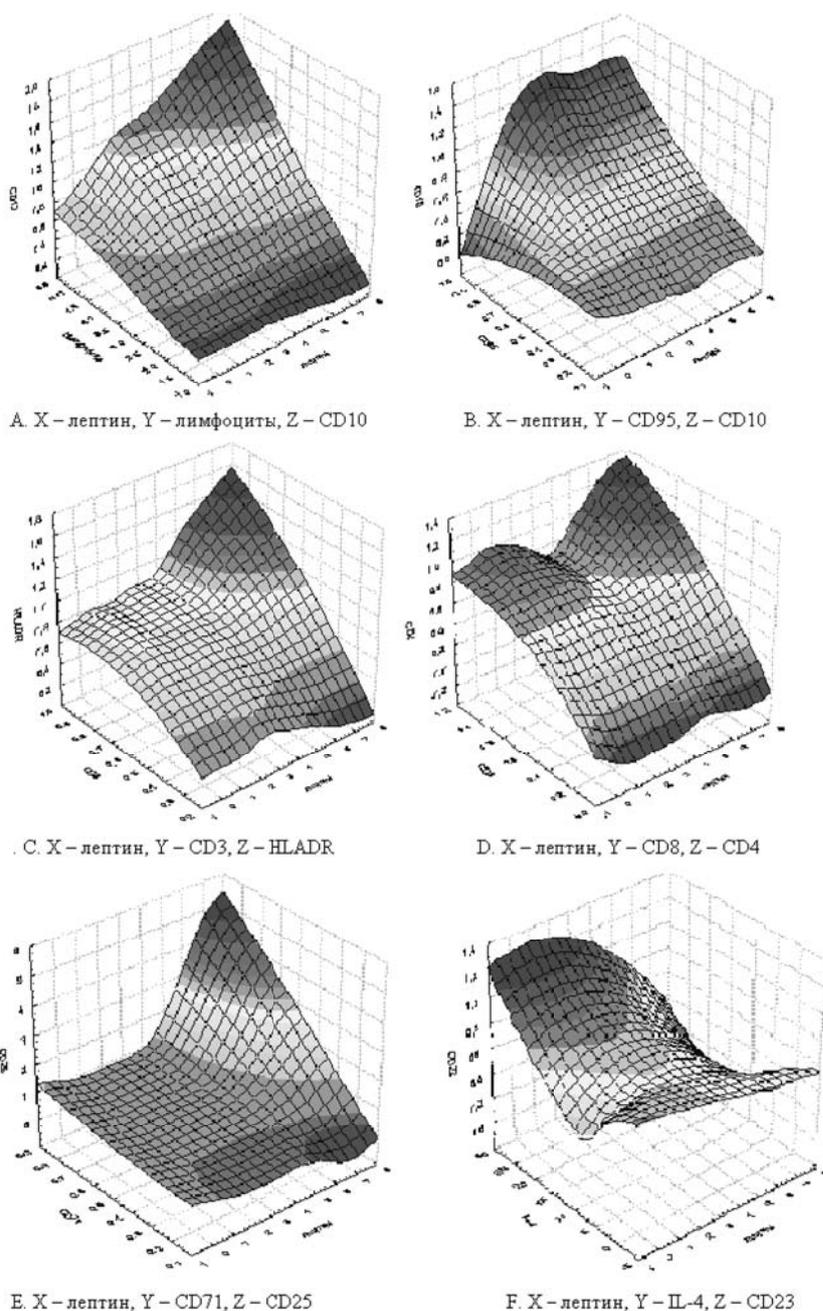


Рис. 3. Зависимость между уровнем лептина и иммунными показателями

ассоциированные с TCR (CD3⁺), клетки, способные к бласттрансформации (CD10⁺), Т-хелперы (CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺), активированные Т-лимфоциты с рецептором к трансферрину CD71 и клетки, меченные к апоптозу (CD95⁺), с другой — двухкомпонентным фактором, содержащим поверхностный идентификатор антигена HLADR и активированные Т-клетки с рецептором CD25 к интерлейкину-2. Модель отражает плейотропный эффект лептина в отношении субпопуляции Т-клеток.

Для уточнения влияния лептина на выработку цитокинов TNF- α и IFN- γ были построены последовательно и без перекрытия графики, включающие все определяемые случаи, что позволило установить характер флуктуаций значений показателей (рис. 2). Графики отражают однонаправленность колебаний концентраций лептина и цитокинов в крови. TNF- α и IFN- γ участвуют в развитии воспаления, активации клеток эндотелия, способствуют миграции Т-клеток из сосудов в ткани, запускают нецитолитические эффекторные механизмы защиты, направляют иммунный ответ по Th1-типу [12].

Визуализация зависимости от уровня лептина изменений других определяемых показателей была получена с помощью статистических 3D-графиков поверхностей, построенных в осях XYZ (где X — концентрация лептина, Y и Z — значения иммунных показателей). Как видно из представленных на рис. 3 (А–Е) графиков, лептин оказывает положительный эффект на большинство определяемых параметров, за исключением IL-4 и клеток с рецептором CD23, в отношении которых эффект был негативный (рис. 3F).

Обсуждение результатов

Установлено, что с увеличением концентрации лептина повышается общее количество и число способных к бласттрансформации лимфоцитов CD10⁺ (рис. 3А), одновременно адекватно, как следствие лимфопролиферации, нарастает содержание меченных к апоптозу клеток CD95⁺ (рис. 3В), объяснимое сдерживающей клеточную продукцию функцией апоптоза [4]. При росте уровня лептина повышаются концентрация зрелых лимфоцитов CD3⁺ и уровень экспрессии молекул МНС II класса (HLADR) (рис. 3С), содержание цитотоксических Т-клеток CD8⁺ и Т-хелперов CD4⁺ (рис. 3D), продукция CD25 и CD71 — маркеров клеточной активации и пролиферации (рис. 3Е). Экспрессия рецепторов к трансферрину CD71 служит сигналом к пролиферации клетки под влиянием IL-2, который усиленно синтезируется клеткой после появления на ее поверхности данного рецептора. Иными словами, влияние лептина согласованно ассоциировано с изменениями концентраций цитокинов (TNF- α , IFN- γ) и иммунокомпетентных клеток (CD3⁺, CD25⁺, CD71⁺, HLADR CD10⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD95⁺), отражающими последовательность развития иммунной реакции: активацию, лимфопролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

Свое действие лептин реализует через OB-Rb-рецептор (изоформа с длинным внутриклеточным доменом), который обеспечивает сигнальную трансдукцию с участием нескольких внутриклеточных путей: JAK/STAT, MAPK, PI3K/Act [9]. Связывание лептина индуцирует димеризацию рецептора, после чего происходит фосфорилирование янус-киназой JAK2 внутриклеточного домена OB-Rb по остаткам тирозина, к которым присоединяются белки-активаторы транскрипции (STAT1, 3, 5, 6). Белки STAT благодаря специфической активности JAK2, в свою очередь, фосфорилируются и димеризуются, затем проникают в ядро, индуцируя экспрессию определенных генов, в том числе активатора транскрипции AP-1 (activator protein-1) [6]. Через взаимодействие фосфорилированных SH2 участков с адапторным белком GRBP2 (growth factor receptor-bound protein) активируется MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальный путь, что ведет к стимуляции экспрессии генов цитокинов IL-2 и IFN- γ , являющихся индукторами формирования Т-хелперных клеток. Активация лептином PI3K/Act пути индуцирует ядерный фактор NF-kB, активирующий экспрессию молекул Bcl-2 и Bcl-X_L, способствующих выживанию клетки [5]. Таким образом, лептин оказывает сигнально-опосредованное стимулирующее влияние на активацию и лимфопролиферацию Т-лимфоцитов через индукцию IL-2 и пролонгирует развитие иммунной реакции посредством усиления секреции IFN- γ .

В то же время увеличение концентрации лептина ассоциировано с низким содержанием IL-4 (антагонист IFN- γ и активатор секреции IgE) и Т-клеток CD23⁺ с рецептором к Fc-фрагменту Ig (FcRII). IL-4 участвует в активации В-клеток и переключении их на синтез IgE, усиливает экспрессию низкоаффинного рецептора CD23 и связывание FcRII с IgE, что приводит к активации лимфоцитов, имеющих данный рецептор. IgE сам способен стимулировать экспрессию CD23 (FcRII). CD23 вовлечен в презентацию антигена В-клеткам и участвует во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов [10]. Активация промотора гена IL-4 фактором транскрипции c-Maf направляет Т-клеточный ответ по Th2-пути [7], в ходе которого происходит апрегуляция экспрессии CD23 под действием IL-4. Установленный эффект лептина в отношении IL-4 и CD23, по всей видимости, связан с особой функцией IgE. Единственное отличие IgE от антител других классов заключается в том, что он способен распознавать конформационные эпитопы, тогда как все остальные антитела распознают только линейные эпитопы белков [2]. Тем самым IgE, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью, предназначен для удаления из организма малых концентраций антигенов, маскированных антигенов, антигенные свойства которых заключаются только в конформационных изменениях поверхностных структур. В дальнейшем было бы интересно выяснить, ингибирует ли лептин инициацию реактивного

механизма защиты, или всего лишь не оказывает на этот процесс никакого влияния.

Заключение. Лептин участвует в иммунных взаимодействиях, оказывая непосредственное влияние на Т-лимфоциты. С одной стороны, лептин повышает количество клеток с рецепторами CD3, CD4, CD8, CD10, CD25, CD71, CD95 и HLADR и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов TNF- α и IFN- γ , с другой — снижает уровень противовоспалительного цитокина IL-4 и содержание клеток с рецептором CD23. Существует согласованное изменение концентраций лептина, TNF- α и IFN- γ в крови. Полученные сведения подчеркивают значимость определения уровня лептина при оценке состояния адаптивного иммунитета и могут представлять интерес при изучении патогенеза болезней, связанных с метаболическими нарушениями, метаболическим синдромом и аутосенсбилизацией.

Список литературы

1. Добродеева Л. К., Жилина Л. П., Типисова Е. В. и др. Пределы физиологического колебания в периферической крови метаболитов, гормонов, лимфоцитов, цитокинов и иммуноглобулинов у жителей Архангельской области. Архангельск, 2005. 52 с.
2. Bogh K. L., Nielsen H., Eiweqger T., Madsen C. B., Mills E. N., Rigby N. M. IgE versus IgG4 epitopes of the peanut allergen Ara h 1 in patients with severe allergy // *Mol. Immunol.* 2014. Vol. 58 (2). P. 169-176.
3. Fernandez-Riejos P., Najib S., Santos-Alvarez J., et al. Role of leptin in the activation of immune cells // *Mediators Inflamm.* 2010. Vol. 2010, Article 568343.
4. Hildeman D., Jorgensen T., Kappler J., Marrack P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. Vol. 19 (5). P. 516-521.
5. Juntilla M. M., Koretzky G. A. Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development // *Immunol. Lett.* 2008. Vol. 116. P. 104-110.
6. Kloek C., Haq A. K., Dun S. L., Lavery H. J., Banks A. S., Myers M. G. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 41547-41555.
7. Lai C.-Y., Lin S.-Y., Wu C.-K., Yen L.-T., Sytwu H.-K., Miaw S.-C. Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhance the expression of IL-4 gene // *Immunol.* 2012. Vol. 189 (4). P.1545-1550.
8. Lam Q. L., Lu L. Role of leptin in immunity // *Cell Mol. Immunol.* 2007. Vol. 4. P. 1-13.
9. Munzberg H., Bjornholm M., Bates S. H., Myers M. G. Leptin receptor action and mechanism of leptin resistance // *Cell Mol. Life/* 2005. Vol. 62. P. 642-652.
10. Novak N., Kraft S., Bieber T. IgE receptors // *Curr. Opin. Immunol.* 2001 Vol. 13 (6). P. 721-726.
11. Procaccini C., De Rosa V., Galgani M., Carbone F., Cassano S. Leptine-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4⁺ effector T cell responses // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189 (6). P. 2941-2953.
12. Sprent J., Surh C. D. Cytokines and T cell homeostasis // *Immunol. Lett.* 2003. Vol. 85. P. 145-149.
13. Zhang F., Chen Y., Heiman M., Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology // *Vitam. Horm.* 2005. Vol. 71. P. 345-372.

References

1. Dobrodeeva L. K., Zhilina L. P., Tipisova E. V. i dr. *Predely fiziologicheskogo kolebanija v perifericheskoj krvi metabolitov, gormonov, limfocitov, citokinov i immunoglobulinov u zhitelej Arhangel'skoj oblasti* [Physiological ranks of metabolites, hormones, lymphocytes, citokines and immunoglobulins in peripheral blood of habitants of Arkhangelsk region]. Arkhangelsk, 2005, 52 p.
2. Bogh K. L., Nielsen H., Eiweqger T., Madsen C. B., Mills E. N., Rigby N. M. IgE versus IgG4 epitopes of the peanut allergen Ara h 1 in patients with severe allergy. *Mol. Immunol.* 2014, 58 (2), pp. 169-176.
3. Fernandez-Riejos P., Najib S., Santos-Alvarez J., et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010, 2010, Article 568343.
4. Hildeman D., Jorgensen T., Kappler J., Marrack P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2007, 19 (5), pp. 516-521.
5. Juntilla M. M., Koretzky G. A. Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development. *Immunol. Lett.* 2008, 116, pp. 104-110.
6. Kloek C., Haq A. K., Dun S. L., Lavery H. J., Banks A. S., Myers M. G. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, pp. 41547-41555.
7. Lai C.-Y., Lin S.-Y., Wu C.-K., Yen L.-T., Sytwu H.-K., Miaw S.-C. Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhance the expression of IL-4 gene. *Immunol.* 2012, 189 (4), pp.1545-1550.
8. Lam Q. L., Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol. Immunol.* 2007, 4, pp. 1-13.
9. Munzberg H., Bjornholm M., Bates S. H., Myers M. G. Leptin receptor action and mechanism of leptin resistance. *Cell Mol. Life.* 2005, 62, pp. 642-652.
10. Novak N., Kraft S., Bieber T. IgE receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2001, 13 (6), pp. 721-726.
11. Procaccini C., De Rosa V., Galgani M., Carbone F., Cassano S. Leptine-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4⁺ effector T cell responses. *J. Immunol.* 2012, 189 (6), pp. 2941-2953.
12. Sprent J., Surh C. D. Cytokines and T cell homeostasis. *Immunol. Lett.* 2003, 85, pp. 145-149.
13. Zhang F., Chen Y., Heiman M., Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam. Horm.* 2005, 71, pp. 345-372.

Контактная информация:

Попов Андрей Александрович — кандидат биологических наук, доцент кафедры биомедицинской химии ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51
E-mail: biochem66@gmail.com