

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

*М.И.Душкин, О.М.Перминова,  
А.Ф.Сафина, Н.Н.Вольский,  
Я.Ш.Шварц, В.А.Козлов*

## **ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ПАРАМЕТРЫ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В МАКРОФАГАХ**

Институт клинической иммунологии, Институт терапии, Новосибирск

Изучено влияние фактора некроза опухоли- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными макрофагами и лимфоцитами и содержащих комплекс биологически активных соединений (в т.ч. цитокинов), на параметры липидного обмена в макрофагах. Показано, что добавление рекомбинантного фактора некроза опухоли- $\alpha$  и сред, кондиционированных иммунокомпетентными клетками, в культуру перитонеальных макрофагов мыши вызывало стимуляцию включения меченого олеата в эфиры холестерина и триглицериды и меченого глицерина в триглицериды, но подавляло включение меченого холестерина в эфиры холестерина. Предполагается, что одним из механизмов влияния активированных иммунокомпетентных клеток на обмен холестерина в макрофагах является стимуляция активности сфингомиелиназы комплексом провоспалительных цитокинов, продуцируемых этими клетками при их активации.

Журн. микробиол., 2004, № 6, С. 52—56

Ключевые слова: цитокины, липидный обмен, эфиры холестерина, триглицериды, макрофаги

### **ВВЕДЕНИЕ**

В последние годы большое внимание уделяется регуляции липидного обмена в макрофагах, что связано с их повышенной способностью накапливать эфиры холестерина (ЭХС) путем рецептор-зависимого поглощения модифицированных ЛПНП и стимуляции скорости эстерификации холестерина (ХС) [14]. Во многих работах показано, что при трансформации макрофагов в «пенистые» клетки большую роль играют изменения экспрессии скэвенджер-рецепторов макрофагов, опосредуемые цитокинами, которые выделяются при

*M.I.Dushkin, O.M.Perminova,  
A.F.Safina, N.N.Volsky,  
Ya.Sh.Shvarts, V.A.Kozlov*

## **INFLUENCE OF THE ACTIVATION OF THE IMMUNE SYSTEM CELLS ON THE PARAMETERS OF LIPID METABOLISM IN MACROPHAGES**

Institute of Clinical Immunology, Institute of Therapy, Novosibirsk, Russia

The influence of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and media, conditioned by activated macrophages and lymphocytes and containing a complex of biologically active compounds (including cytokines), on the parameters of lipid metabolism in macrophages was studied. The addition of recombinant TNF- $\alpha$  and immunocompetent cell-conditioned media to mouse peritoneal macrophages culture stimulated labelled oleate incorporation into cholesterol esters and triglycerides, as well as labelled glycerine incorporation into cholesterol esters, but inhibited labelled cholesterol incorporation into cholesterol esters. One of the mechanisms of the influence of activated immunocompetent cells on cholesterol metabolism in macrophages was, supposedly, the stimulation of sphingomyelinase activity by a complex of anti-inflammatory cytokines produced by these cells on their activation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2004, No. 6, P. 52—56

Key words: cytokines, lipid metabolism, cholesterol esters, triglycerides, macrophages

активации клеток (в частности, лимфоцитов и макрофагов) [10]. В то же время интернализация модифицированных ЛПНП макрофагами не является единственной возможной причиной увеличения пула свободного ХС и накопления ЭХС в клетках. Подобные изменения могут быть также следствием повышенного выхода ХС из клеточных мембран или эндогенного синтеза ХС в клетках [13]. Однако изменения липидного обмена в макрофагах под влиянием цитокинов, не связанные с поступлением экзогенного ХС (в составе ЛПНП) в клетки, изучены еще

недостаточно. Целью данной работы было исследование основных параметров липидного метаболизма макрофагов при действии комплекса цитокинов и других биологически активных соединений, секретлируемых макрофагами и лимфоцитами в ответ на их активацию.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 180 мышах-самцах линий СВА, С57BL/6 и гибридах F<sub>1</sub>(СВА x С57BL/6). Животных получали из вивария СО РАМН в возрасте 3 — 4 месяцев. 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).

Перитонеальные макрофаги мыши получали общепринятым методом на 4 сутки после внутрибрюшинного введения 1,5 мл тиогликолевого бульона. Макрофаги и спленоциты мышей инкубировали в пластиковых планшетах в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 2мМ глутамина и 50мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37<sup>0</sup>С. Среды, кондиционированные активированными перитонеальными макрофагами мыши, получали после 24-час инкубации макрофагов с липополисахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* O111:B4 (20 мкг/мл). Среды, кондиционированные активированными спленоцитами мыши, получали либо после 48-час инкубации спленоцитов с конканавалином А (5 мкг/мл), либо от первичной двухсуточной двунаправленной смешаной культуры спленоцитов мышей линий СВА и С57BL/6. Параметры липидного метаболизма определяли после 18-час инкубации резидентных макрофагов с содержащими цитокины средами (в разведении 25% и 50%) или с рекомбинантным фактором некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ). Результаты сравнивали с соответствующим контролем, в качестве которого использовали инкубацию макрофагов со средами, кондиционированными интактными (неактивированными) клетками.

Скорость биосинтеза ЭХС и триглицеридов в макрофагах оценивали по скорости включения [1-<sup>14</sup>С]-олеата, [1,2-<sup>3</sup>Н]-ХС и [2-<sup>3</sup>Н]-глицерина [8]. Для этого клетки инкубировали в течение 4 час в среде RPMI-1640, содержащей 0,2% БСА и 0,2

мМ [<sup>14</sup>С]-олеата, связанного с БСА (или 0,2 нМ [<sup>3</sup>Н]-ХС, или 4 нМ [<sup>3</sup>Н]-глицерина). Клеточные липиды экстрагировали *in situ* смесью гексан:изопропанол (3:2, V/V), концентрировали под током азота, растворяли в хлороформе и разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol в системах растворителей гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (60:40:1 и 90:10:1, V/V), используя соответствующие стандарты ЭХС и триглицеридов (Sigma) [1]. Пятна ЭХС и ТГ проявляли в парах йода, соскребали их в сцинтилляционные вials и подсчитывали радиоактивность в толуольном сцинтилляторе в сцинтилляционном счетчике Mark-III (Tracor Analytical, Голландия). Результаты выражали в нМ эстерифицированного олеата и пМ эстерифицированных ХС и глицерина на мг клеточного белка. Белок определяли по методу Лоури [11] после экстракции липидов из макрофагов, используя в качестве стандарта БСА.

Статистическую значимость различий между исследуемыми показателями оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

В условиях *in vitro* мы изучили влияние ФНО- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными иммунокомпетентными клетками, на липидный метаболизм в перитонеальных макрофагах мыши. Показателями, характеризующими липидный обмен в макрофагах, служили скорости включения меченых субстратов в различные фракции клеточных липидов.

Установлено, что добавление сред, кондиционированных активированными макрофагами и лимфоцитами, в культуру перитонеальных макрофагов с последующей 18-час инкубацией клеточной культуры приводило к достоверному увеличению (в 1,2 — 3,6 раза) скорости включения меченого олеата в ЭХС и триглицериды (табл.).

Результаты опытов по включению в триглицериды другого меченого предшественника — глицерина — представлены на рис. 1. Видно, что эффект активации клеток иммунной системы также выражается в резком увеличении измеряемого показателя (в 4,4 — 5,5 раза).

На рис.2 представлено влияние сред, кондиционированных активированными иммунокомпетентными клетками, на включение меченого ХС в ЭХС. Видно, что полученные данные резко отличаются от

**Влияние ФНО- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными макрофагами и лимфоцитами, на скорость включения меченого олеата во фракции клеточных липидов в перитонеальных макрофагах мыши ( $M \pm m$ )**

Воздействие	Включение олеата в ЭХС <sup>a</sup>	Включение олеата в триглицериды <sup>a</sup>
Среда, кондиц. интактными спленоцитами мышей (СВА×С57В1)F <sub>1</sub> + КонА (5 мкг/мл)		
25%	0,159±0,014	4,665±0,84
50%	0,242±0,040	7,444±0,59
Среда, кондиц. Кон А-стимулированными (5 мкг/мл) спленоцитами мышей (СВА×С57В1)F <sub>1</sub>		
25%	0,293±0,065	9,302±0,44
50%	0,484±0,010***	13,164±0,59*
Смесь сред, кондиц. интактными спленоцитами мышей СВА и С57В1		
25%	0,201±0,013	9,205±0,432
50%	0,202±0,016	10,858±0,344
Среда, кондиц. смешанной культурой спленоцитов мышей СВА и С57В1		
25%	0,450±0,044*	11,304±0,459**
50%	0,721±0,047**	19,114±1,109***
Культуральная среда 100%		
	0,653±0,023	26,593±0,081
Фактор некроза опухоли- $\alpha$		
5 нг/мл	0,863±0,046	26,779±0,219
25 нг/мл	1,619±0,019**	39,339±0,748**
50 нг/мл	1,864±0,092**	42,616±0,584**
100 нг/мл	2,542±0,072**	46,804±0,256***

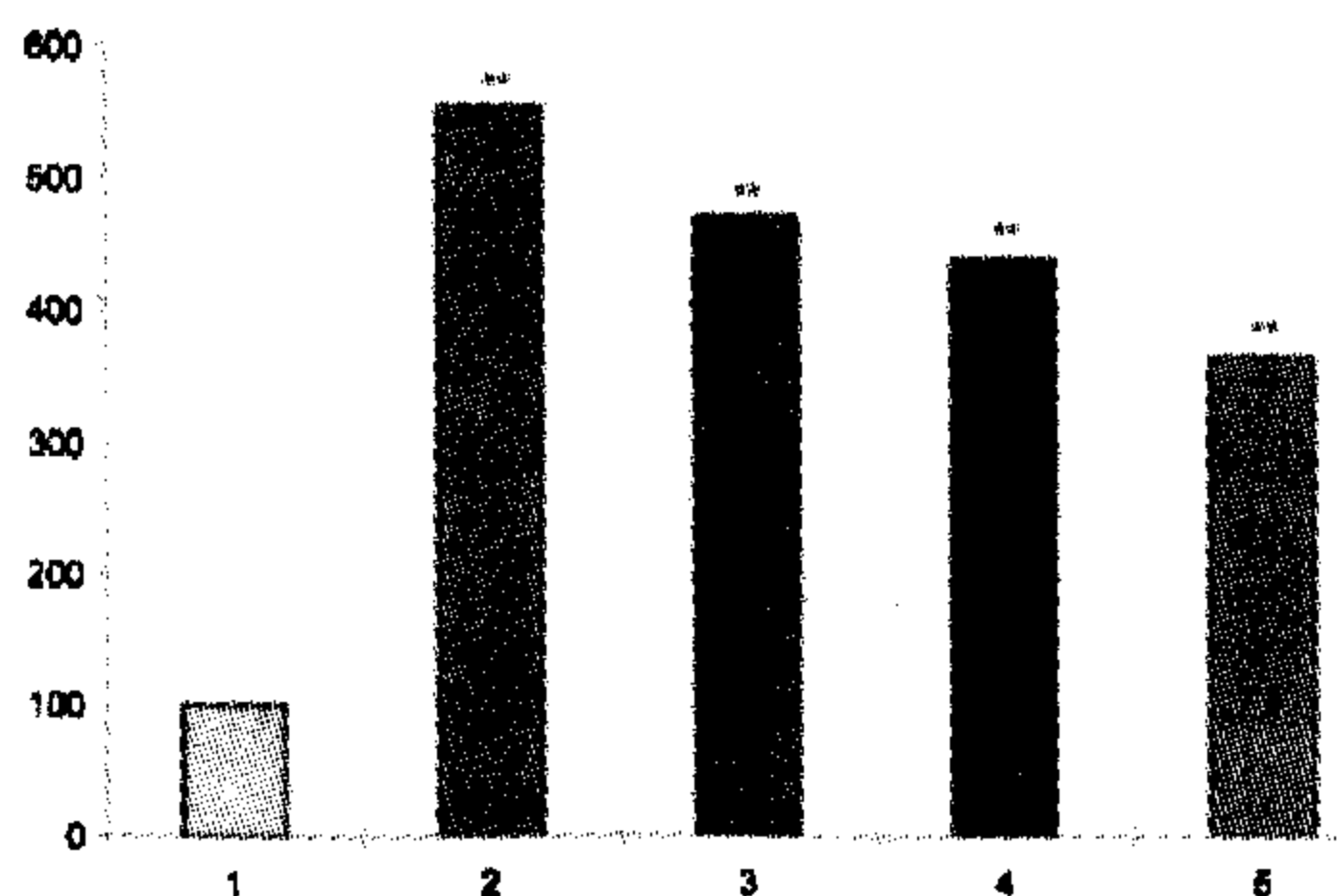
**Примечание.** <sup>a</sup>нмоль эстерифицированного олеата/мг белка/4 часа; достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

данных предыдущих опытов: исследованные среды не вызывают статистически значимых изменений в скорости включения метки.

Таким образом, среды, кондиционированные активированными макрофагами и лимфоцитами и содержащие, как известно, комплекс провоспалительных цитокинов и других регуляторных факторов, секретруемых этими клетками в инкубационную среду после их активации, при действии *in vitro* на перитонеальные макрофаги мыши стимулируют включение олеата и глицерина в клеточные липиды и не влияют на метаболические превращения ХС в этих клетках.

Одним из цитокинов, содержащихся в среде, кондиционированной ЛПС-активи-

рованными макрофагами, является ФНО- $\alpha$  [15], оказывающий заметное влияние на липидный метаболизм макрофагов [4]. Возможно, наблюдаемые в наших экспериментах изменения липидного метаболизма обусловлены, отчасти, присутствием в этих средах ФНО- $\alpha$ . Для проверки этого предположения было изучено влияние рекомбинантного ФНО- $\alpha$  на метаболические превращения холестерина и других липидов в перитонеальных макрофагах мыши. Из данных табл. видно, что 18-час преинкубация макрофагов с различными концентрациями ФНО- $\alpha$  приводит к достоверному увеличению скорости включения [<sup>14</sup>C]-олеата в ЭХС. Аналогичный эффект ФНО- $\alpha$  оказывает и на включение меченого олеата в другую липидную фракцию — триглицериды. Эффект действия ФНО- $\alpha$  (100 нг/мл) на скорость включения глицерина в триглицериды также выражается в резком (в 3,6 раза) увеличении измеряемого показателя (рис. 1). На рис. 2 показано влияние ФНО- $\alpha$  (100 нг/мл) на включение [<sup>3</sup>H]-ХС в ЭХС. Видно, что этот эффект принципиально отличается от воздействия ФНО- $\alpha$  на включение меченых олеата и глицерина в исследованные липидные фракции: добавление ФНО- $\alpha$  в культуру перитонеальных макрофагов мыши вызывает увеличение скорости включения олеата и глицерина в клеточ-



**Рис 1.** Влияние рекомбинантного фактора некроза опухоли- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными макрофагами и спленоцитами мыши, на скорость включения глицерина в триглицериды в перитонеальных макрофагах мышей (СВА×С57В1)F<sub>1</sub>. По оси ординат — включение глицерина в триглицериды, % от контроля; здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — воздействие; 1 — контроль; 2 — среда, кондиционированная первичной двунаправленной смешанной культурой спленоцитов мышей линий СВА и С57В1; 3 — среда, кондиционированная Кон А-стимулированными спленоцитами мышей (СВА×С57В1)F<sub>1</sub>; 4 — среда, кондиционированная ЛПС-активированными макрофагами мышей (СВА×С57В1)F<sub>1</sub>; 5 — рекомбинантный фактор некроза опухоли- $\alpha$ . \*\*Статистически достоверное отличие от контроля ( $p < 0,01$ ).

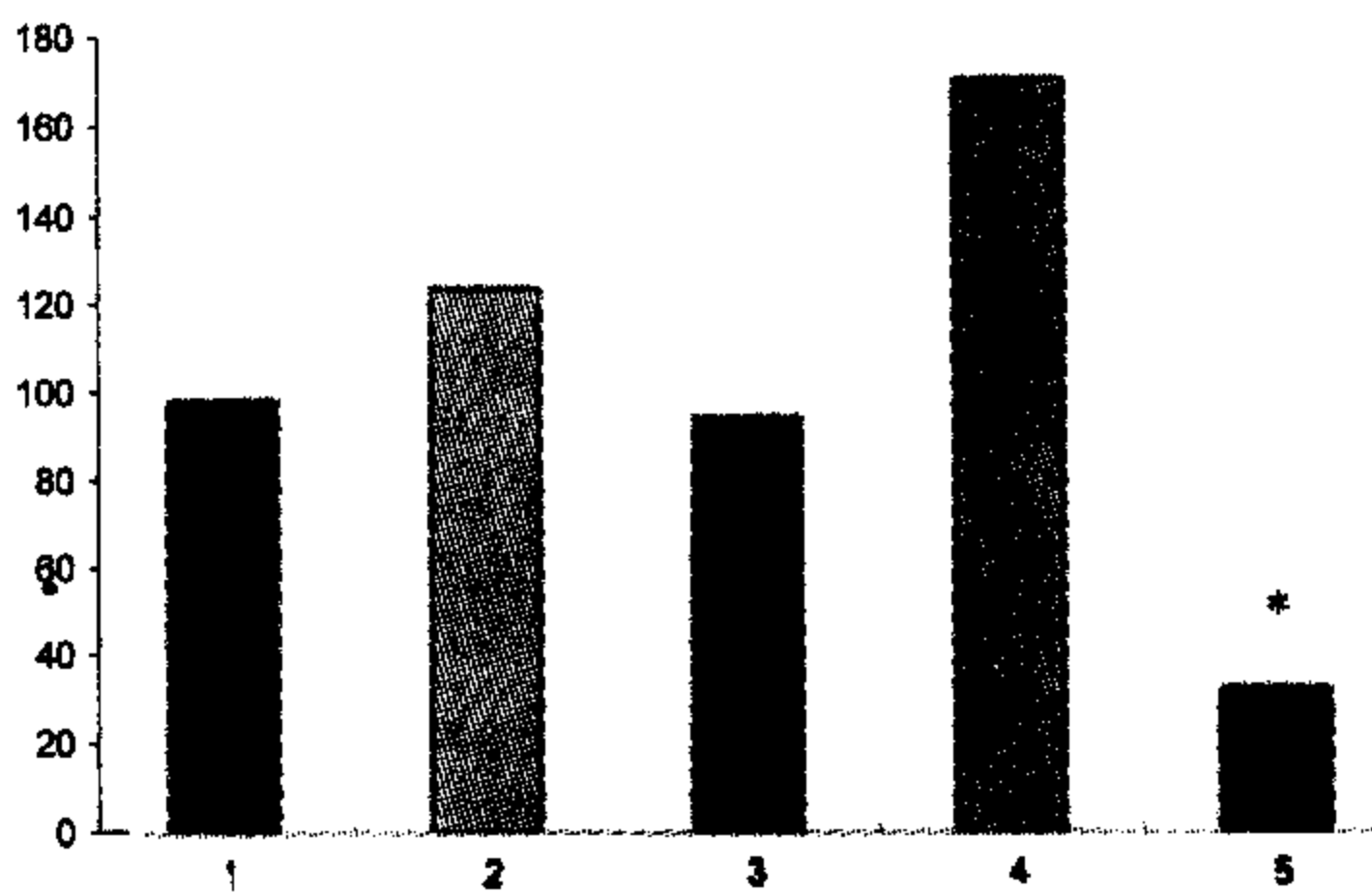


Рис. 2. Влияние фактора некроза опухоли- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными макрофагами и спленоцитами мыши, на скорость включения холестерина в эфиры холестерина в перитонеальных макрофагах мышей (CBAx57Bl) $F_1$ .

По оси ординат — включение холестерина в эфиры холестерина, % от контроля. \*Статистически достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).

ные липиды и в то же время снижает скорость включения меченого ХС в ЭХС.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о принципиальном сходстве эффектов рекомбинантного ФНО- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными лимфоцитами и макрофагами, на исследованные параметры липидного метаболизма в макрофагах. Различаясь (иногда существенно) по выраженности, эти эффекты совпадают по направленности воздействия на синтез ЭХС и триглицеридов. Отсюда естественно предположить, что главным действующим на липидный метаболизм фактором, продуцируемым иммунокомпетентными клетками при активации, является комплекс провоспалительных цитокинов (таких как ФНО- $\alpha$ , интерлейкин-1, интерферон- $\gamma$ ).

Обсуждая влияние ФНО- $\alpha$  на липидный метаболизм макрофагов, мы сталкиваемся с видимой противоречивостью полученных нами экспериментальных результатов. Действительно, по аналогии с включением олеата и глицерина в триглицериды (табл. и рис.1 соответственно) следовало бы ожидать увеличения скорости включения ХС в ЭХС под влиянием как ФНО- $\alpha$ , так и сред, кондиционированных активированными макрофагами и лимфоцитами. Однако, в отличие от повышения скорости включения олеата в ЭХС под влиянием ФНО- $\alpha$  и сред, кондиционированных активированными клетками иммунной системы (табл.), мы видим отсутствие эффекта или соответствующее уменьшение включения [ $^3H$ ]-ХС в ЭХС (рис. 2).

Это кажущееся противоречие можно объяснить эффектом разбавления метки. Важнейшим следствием воздействия цитокинов, продуцируемых активированными макрофагами и лимфоцитами (таких как ФНО- $\alpha$ , интерлейкин-1, интерферон- $\gamma$ ), на клетки является активация фермента сфингомиелиназы [6, 12], который расщепляет липид клеточной мембраны сфингомиелин с образованием церамида [5, 7]. В то же время хорошо известно, что сфингомиелин играет роль «якоря», удерживающего ХС в клеточных мембранах [3], так что его расщепление сопровождается выходом ХС из мембран в клетки. Это приводит к пополнению цитоплазматического пула свободного ХС [7], снижению его синтеза и повышению включения ХС в ЭХС [13].

На основании данных литературы, следует ожидать увеличения пула свободного ХС в макрофагах при действии ФНО- $\alpha$ , что может быть объяснено обнаруженным нами снижением включения меченого ХС в ЭХС под влиянием этого цитокина, хотя сам процесс образования ЭХС происходит даже быстрее, чем в интактных макрофагах, что видно из полученных нами данных об увеличении скорости включения меченого олеата в ЭХС.

Однако все эффекты воздействия ФНО- $\alpha$  на липидный обмен в макрофагах не могут быть объяснены механизмом мобилизации свободного ХС из мембран. Действительно, приведенные в табл. данные свидетельствуют, что ФНО- $\alpha$  увеличивает скорость образования не только ЭХС, но и триглицеридов — эффект, который сложно связать с количеством свободного ХС в клетке. Стимулирующее действие ФНО- $\alpha$  (а кроме того интерлейкина-1 и интерферона- $\alpha$ ) на скорость включения глицерина в триглицериды было также обнаружено и на другом типе клеток (клеточной линии НерG2) [9].

Чтобы объяснить, каким образом ФНО- $\alpha$  и среды, кондиционированные активированными лимфоцитами и макрофагами и содержащие, кроме обсуждаемых провоспалительных цитокинов, другие биологически активные соединения, способны увеличивать скорость включения меченых олеата и глицерина в триглицериды, можно предположить, как это было сделано в работе [2], что механизм действия эффекта активации клеток иммунной системы на эти параметры заключается в увеличении клеточного пула коэнзима А. Действи-

тельно, увеличение свободного коэнзима А в макрофагах должно приводить как к увеличению пула ацильных производных коэнзима А и отсюда — к увеличению скорости синтеза триглицеридов (что выражается в увеличении скорости включения меченого глицерина), так и к увеличению скорости активации добавленного меченого олеата с присоединением коэнзима А и отсюда — к увеличению скорости включения этой метки в триглицериды и ЭХС (что мы и наблюдаем в наших экспериментах).

Полученные данные свидетельствуют, что накопление липидов, и в частности, ЭХС в макрофагах, имеющее ключевое значение для образования пенистых клеток, может происходить независимо от поглощения ими липопротеинов через скэвенджер-рецепторы. Факторы, секретируемые иммунокомпетентными клетками при их функциональной активации, могут выступать в роли регуляторов липидного обмена в макрофагах, причем важнейшая роль в этом процессе принадлежит, вероятно, комплексу провоспалительных цитокинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Душкин М.И., Долгов А.В. Активность ферментов холестеринового метаболизма и содержание липидов в печени, аорте, надпочечниках и сыворотке крови крысы при воздействии тритона WR1339. *Вопр. мед. химии.* 1986, 32 (3): 98 — 101.
2. Душкин М.И., Корнюш Е.Н., Поляков Л.М. и др. Биосинтез липидов и метаболизм нативных и ацетилированных липопротеидов низкой плотности в макрофагах, стимулированных зимозаном *in vivo* и *in vitro*. *Биохимия.* 1992, 57 (8): 1181 — 1191.
3. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимирюв Ю.А. и др. Холестериноз. М., Медицина, 1983.
4. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. Цитокины, иммунное воспаление и атерогенез. *Успехи современной биологии.* 1996, 116 (3): 320 — 331.
5. Cai Z., Bettaieb A., Mahdani N.E. et al. Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of human breast carcinoma MCF7 cells to tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1997, 272 (11): 6918 — 6926.
6. Chakraborty G., Ziemba S., Drivas A. et al. Myelin contains neutral sphingomyelinase activity that is stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *J. Neurosci. Res.* 1997, 50 (3): 466 — 476.
7. Degan B.M., Bourdelat-Parks B., Daniel A. et al. Sphingomyelinase inhibits *in vitro* Leydig cell function. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1996, 26 (3): 234 — 242.
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. Grunfeld C., Dinarello C.A., Feingold K.R. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interferon-alpha stimulate triglyceride synthesis in HepG2 cells. *Metabolism.* 1991, 40 (9): 894 — 898.
10. Hsu H.Y., Nicholson A.C., Hajjar D.P. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J. Biol. Chem.* 1996, 271 (13): 7767 — 7773.
11. Lowry H., Roenbrought N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Ibid.* 1951, 193 (1): 265 — 275.
12. Pekary A.E., Chopra I.J., Berg L. et al. Sphingomyelinase and phospholipase A2 regulate type I deiodinase expression in FRTL-5 cells. *Thyroid.* 1997, 7 (4): 647 — 654.
13. Scheek S., Brown M.S., Goldstein J.L. Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 94 (21): 11179 — 11183.
14. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 2002, 110 (7): 905 — 911.
15. Wu C.H., Chen T.L., Chen T.G. et al. Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J. Trauma.* 2003, 55 (3): 540 — 545.

Поступила 19.10.03