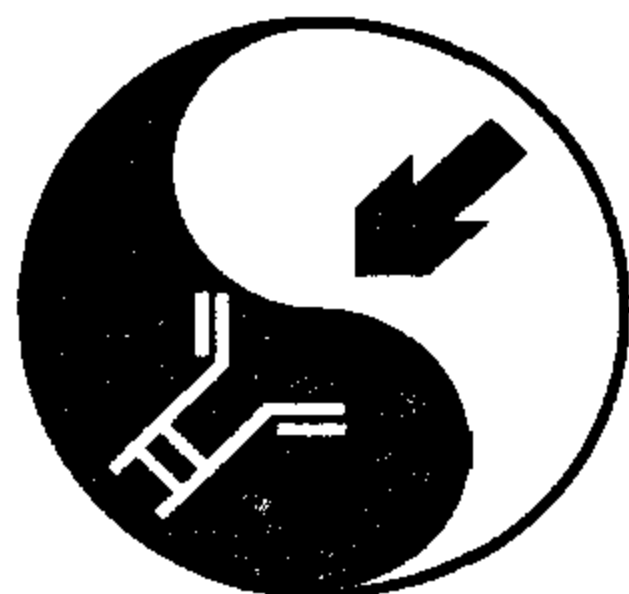


**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК**  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

# СИСТЕМА ЦИТОКИНОВ



## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Под редакцией  
академика РАМН *В.А. Козлова*,  
доктора медицинских наук, профессора *С.В. Сенникова*



НОВОСИБИРСК  
“НАУКА”  
2004

**О.М. Перминова\***, **Н.Н. Вольский\***, **М.И. Душкин\*\***

*\*НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск,*

*\*\*НИИ терапии СО РАМН, г. Новосибирск*

## **ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ ХОЛЕСТЕРИНА В МАКРОФАГАХ**

### **Введение**

В последние годы большое внимание уделяется регуляции липидного обмена в макрофагах, что связано с их повышенной способностью накапливать эфиры холестерина (ЭХС)<sup>1</sup> путем рецептор-за-

---

<sup>1</sup> Принятые сокращения: АХАТ — ацил-КоА: холестерин-О-ацилтрансфераза, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности, ЛПС — липополисахарид, СР — скэвенджер-рецептор, ФМА — форбол-12-миристан-13-ацетат, ХС — холестерин, ЭХС — эфиры холестерина, АВС1 — АТФ-связывающий кассетный переносчик 1.

висимого поглощения модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и стимуляции скорости эстерификации холестерина (ХС) [40]. Внутриклеточная аккумуляция ХС, приводящая к трансформации макрофагов в пенистые клетки, является одним из отличительных признаков атеросклеротического повреждения артерий. Поэтому рассмотрение механизмов регуляции холестеринанового метаболизма в макрофагах тесно связано с современными представлениями об атерогенезе.

Атеросклероз рассматривается сегодня как своеобразный воспалительный процесс, индуцируемый факторами повреждения артериальной стенки на фоне нарушений липидного метаболизма и ассоциированный с системным и локальным иммунным ответом на окисленные липопротеины и другие антигены [5, 28]. Атероматозные повреждения артерий характеризуются фокальными скоплениями происходящих из макрофагов пенистых клеток, содержащих большое количество эфиров холестерина, клеток воспаления, в том числе макрофагов и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, большинство из которых являются иммунореактивными по отношению к окисленным липопротеинам, гладкомышечных клеток, отложений липидов и экстрацеллюлярного матрикса. Активированные в процессе воспалительного (иммунного) ответа макрофаги и лимфоциты продуцируют цитокины, обнаруживаемые в тканях лимфоидных органов и атеросклеротических бляшках животных и человека, что подтверждается также выявлением мРНК различных цитокинов, в том числе ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-12, М-КСФ, в очагах активного атерогенеза [3, 13, 46]. Продуцируемые иммунокомпетентными клетками цитокины могут влиять на различные аспекты атеросклеротического процесса, включая захват и деградацию окисленных липопротеинов, продукцию активированных кислородных метаболитов, экспрессию молекул адгезии, пролиферацию гладкомышечных клеток.

За последние 30 лет появилось много публикаций, посвященных вопросам регуляции цитокинами холестеринанового обмена в макрофагах. Целью данного обзора является рассмотрение двух аспектов этой проблемы, связанных с регуляцией поступления ХС в макрофаги и его перераспределением в клетках под воздействием цитокинов.

### **Влияние цитокинов на захват холестерина макрофагами и его отток из клеток**

Макрофаги экспрессируют особый вид рецепторов, так называемые скэвенджер-рецепторы (СР) класса А (тип I и II), которые опосредуют захват химически модифицированных ЛПНП (таких как

ацетилированные и окисленные ЛПНП), ЛПС и некоторых других макромолекулярных комплексов с повышенным поверхностным отрицательным зарядом. При этом, в отличие от экспрессии В-, Е-рецепторов (для нативных ЛПНП), экспрессия СР макрофагами не регулируется содержанием ХС в клетках. О важности изучения механизмов, регулирующих экспрессию СР, свидетельствуют эксперименты, использующие двойную нокаутную стратегию. На мышах, нокаутированных по гену апопротеина Е и способных развивать характерные для атеросклеротического повреждения изменения, показано, что дополнительное нокаутирование по гену макрофагального СР класса А приводит к уменьшению размеров атероматозных повреждений артерий [38]. Кроме того, установлено, что регуляция экспрессии СР может влиять на трансформацию макрофагов в пенистые клетки [15], появление которых характерно для ранних стадий атерогенеза. Во многих работах показано, что важным фактором, регулирующим экспрессию СР на мембране макрофагов и соответственно их трансформацию в пенистые клетки, являются цитокины, которые секретируются различными типами клеток [25].

Известно, что эндотелиальные и гладкомышечные клетки артерий человека и животных продуцируют М-КСФ в ответ на различные стимулы и что мРНК этого цитокина обнаруживается в атеросклеротических повреждениях [12]. Экспериментами *in vitro* выявлено, что М-КСФ повышает экспрессию гена СР в человеческих моноцитах [12] и макрофагах мыши [15, 16] и что это сопровождается увеличением захвата модифицированных ЛПНП, способствуя генерации пенистых клеток [12, 15]. В работе [24] изучено влияние М-КСФ на индуцированную ЛПНП эстерификацию ХС в моноцитах/макрофагах человека. Установлено, что обработка клеток в течение 10 дней М-КСФ (128 нг/мл) в 8 раз повышает захват и деградацию ацетилированных ЛПНП, эти показатели для нативных ЛПНП также увеличиваются, но в меньшей степени. Такие эффекты М-КСФ объясняются возрастанием связывания ЛПНП с клеточной поверхностью макрофагов за счет увеличения количества рецепторов, как опосредующих интернализацию модифицированных ЛПНП, так и тех, которые осуществляют захват нативных ЛПНП. Показано также, что М-КСФ дозозависимо (в концентрациях от 0,5 до 128 нг/мл) повышает скорость включения [<sup>14</sup>С]олеата в ЭХС макрофагов. После предварительной обработки клеток М-КСФ (128 нг/мл) скорость эстерификации ХС, индуцированной ацетилированными ЛПНП, повышается в 24 раза, т.е. значительно больше, чем скорость захвата ацетилированных ЛПНП. Авторы предполага-

ют, что в данном случае цитокин не только влияет на величину внутриклеточного пула свободного ХС, но и непосредственно стимулирует активность фермента, эстерифицирующего ХС — ацил-КоА:холестерин-О-ацил-трансферазы (АХАТ). М-КСФ повышает также эстерификацию ХС в макрофагах и в отсутствие липопротеинов, однако этот эффект был менее выражен — от 0,05 до 0,2 нМ/мкг ДНК. В среде без липопротеинов обработка макрофагов М-КСФ (128 нг/мл) в 3 раза повышает внутриклеточное накопление свободного ХС и в 10 раз — ЭХС.

В этой же работе показано, что аналогичным стимулирующим влиянием на скорость эстерификации ХС обладают ГМ-КСФ и ИЛ-1, в то время как Г-КСФ и ФНО- $\alpha$  существенно не изменяли этого параметра. Данные об эффекте ИЛ-1 согласуются с результатами исследований других авторов, выполненных на мышинной макрофагальной линии J774 [26]. Установлено, что ИЛ-1 $\beta$  дозозависимо (в концентрациях от 10 до 30 нг/мл) повышает скорость включения [ $^{14}\text{C}$ ]олеата в ЭХС в J774 макрофагах в присутствии ацетилированных ЛПНП по сравнению с контролем (в отсутствие ИЛ-1 $\beta$ ), что сопровождается увеличением аккумуляции ХС как в свободной, так и в эстерифицированной форме. Сходные результаты получены на макрофагах мыши также относительно влияния на этот процесс ГМ-КСФ. Установлено [13], что добавление этого цитокина в дозе 10 нг/мл приводит к трехкратному увеличению скорости эстерификации ХС в перитонеальных макрофагах мыши, которая индуцировалась ацетилированными ЛПНП. В то же время данные о влиянии ГМ-КСФ на экспрессию СР класса А в клетках макрофагального ряда противоречивы: в экспериментах *in vitro* наблюдалось как повышение экспрессии рецептора, которая исходно подавлялась липополисахаридом (ЛПС) [43], так и ее снижение [42]. При этом в последней работе было обнаружено, что уменьшение количества СР на мембранах макрофагов человека под влиянием ГМ-КСФ сопровождалось снижением уровня накопления ЭХС в клетках после инкубации с ацетилированными ЛПНП [42].

ИЛ-4 также может участвовать в процессах атерогенеза, влияя на индуцированную модифицированными ЛПНП аккумуляцию ХС в МФ. Этот цитокин обнаруживается в атеросклеротических повреждениях артерий человека [32, 37] и мышей, нокаутированных по апопротеину Е [27], и может влиять на обмен ХС в макрофагах. Установлено [13], что обработка ИЛ-4 (10 нг/мл) клеток линии J774 или перитонеальных макрофагов мыши с последующей инкубацией клеток в присутствии ацетилированных ЛПНП в несколько раз повышает скорость включения [ $^{14}\text{C}$ ]олеата в ЭХС по сравнению с контролем (без цитокина). Этот эффект ИЛ-4 полностью ингибируется антагонистом

СР класса А фукоиданом и на 74 % — моноклональными антителами к СР. В то же время ИЛ-4 не влиял на эстерификацию ХС, индуцированную нативными ЛПНП и  $\beta$ -липопротеинами очень низкой плотности (ЛПОНП). Определение изотерм связывания показало, что ИЛ-4 увеличивает количество сайтов, связывающих ацетилированные ЛПНП на поверхности макрофагов, но этот эффект не сопровождается увеличением синтеза белка СР. Авторы предположили, что эффект ИЛ-4 опосредуется его регулирующим влиянием на активность СР класса А на посттрансляционном уровне, как это было показано на примере М-КСФ. (Стимуляция этим цитокином индуцированного липопротеинами синтеза ЭХС в макрофагах опосредуется его влиянием на передислокацию белка СР из перинуклеарного региона к клеточной поверхности [16].)

Описанный выше эффект ИЛ-4 на обмен ХС может быть блокирован другими цитокинами. В частности, ФНО- $\alpha$  (10 нг/мл) почти полностью, а ТРФ- $\beta$  (10 нг/мл) наполовину отменяют вызванную ИЛ-4 стимуляцию включения меченого олеата в ЭХС макрофагов в присутствии ацетилированных ЛПНП [13].

Что касается воздействия ФНО- $\alpha$  на поглощение модифицированных ЛПНП макрофагами, то результаты как цитируемой работы, так и многих других свидетельствуют о его ингибирующем влиянии на этот процесс. В исследовании [22], проведенном на клетках человеческой моноцитарной линии ТНР-1, дифференцированных под воздействием форболмиристатацетата (ФМА), установлено, что обработка клеток ФНО- $\alpha$  (200 U/мл) в течение 1–2 дней на 70–80 % снижает уровень мРНК как I, так и II типа СР класса А. Чтобы определить, было ли это снижение следствием регулирующего влияния ФНО- $\alpha$  на этапе транскрипции гена СР, в клетки ТНР-1 вводили гибридную ДНК, содержащую промотор гена СР и кодирующий регион гена люциферазы. При этом ФНО- $\alpha$  лишь на 20 % снижал индуцированную ФМА люциферазную активность, управляемую промотором гена СР, и, следовательно, изменение скорости транскрипции гена СР играет лишь второстепенную роль в механизме действия ФНО- $\alpha$ . Авторы пришли к выводу, что основная часть эффекта цитокина связана с увеличением скорости деградации мРНК СР, поскольку обработка ТНР-1-клеток ФНО- $\alpha$  в присутствии актиномицина D в 4 раза (от 40 до 10 ч) уменьшала период полужизни исследуемой мРНК. Циклогексимид (10 мкг/мл) предотвращал снижение уровня мРНК СР, индуцированное ФНО- $\alpha$ , что свидетельствует о необходимости синтеза белка de novo для вызываемого цитокином процесса дестабилизации мРНК СР. Функциональные последствия эффекта ФНО- $\alpha$  выражались в снижении количества сайтов, связы-

вающих меченые ацетилированные ЛПНП, без существенного изменения аффинности рецепторов: дифференцировка ТНР-1-клеток под влиянием ФМА или М-КСФ приводила к увеличению количества сайтов связывания в 6–7 раз по сравнению с исходным уровнем, а воздействие ФНО- $\alpha$  (200 U/мл) снижало этот параметр до величины, характерной для недифференцированных клеток. Еще один обнаруженный в данной работе эффект ФНО- $\alpha$  заключался в снижении (на 65 %) активности АХАТ, измеряемой в гомогенате клеток, и в соответствующем снижении эстерификации ХС, оцениваемой по скорости включения меченого олеата в ЭХС клеток.

В сходной экспериментальной системе (на культуре моноцитов/макрофагов человека) было показано [43], что ингибирование экспрессии, синтеза и функциональной активности СР при обработке клеток ЛПС (100 нг/мл) опосредуется, главным образом, аутокринным действием ФНО- $\alpha$ . Антитела к этому цитокину отменяют индуцированную ЛПС супрессию рецептора, в то же время антитела к ИФН- $\gamma$  или ИЛ-1 $\beta$  таким эффектом не обладали. ФНО- $\alpha$ , добавленный в культуру моноцитов/макрофагов в отсутствие ЛПС, подавляет активность СР в той же степени, что и ЛПС.

Ингибирующий эффект ИЛ-6 на интернализацию ацетилированных ЛПНП моноцитами из периферической крови человека и макрофагоподобными клетками линии ТНР-1, дифференцировавшимися под воздействием ФМА, также объясняется снижением экспрессии СР класса А при действии этого цитокина на клетки [25]. Те же авторы [25] выяснили, что ИЛ-6 уменьшает количество рецепторного белка в клетках, действуя как на уровне транскрипции его мРНК, так и на этапе синтеза белка. По-видимому, механизм действия ИЛ-6 опосредуется его влиянием на активность фактора транскрипции, подобного AP-1/ets, который имеет специфические сайты связывания в промоторном участке гена, кодирующего этот рецептор.

Еще одним провоспалительным цитокином, эффекты которого на метаболизм ХС в макрофагах достаточно хорошо изучены, является ИФН- $\gamma$ . Патологическая роль атерогенных эффектов ИФН- $\gamma$  была показана *in vivo* во многих исследованиях, в частности, в работе на двух линиях мышей, различающихся по устойчивости к воздействию атерогенной диеты [23]. У мышей линии С57В1/6 при длительном кормлении пищей с большим содержанием жира и ХС развиваются атеросклеротические поражения аорты, в то время как мыши линии BALB/с устойчивы к такому воздействию. Авторы обсуждаемой работы предположили, что наблюдаемые межлинейные различия в устойчивости к развитию атеросклероза обусловлены

различиями в соотношении Th1- и Th2-лимфоцитов у мышей этих линий: у C57Bl/6 преобладают Th1-клетки, а у BALB/c — Th2-лимфоциты. Правильность такого предположения подтверждается тем, что 1) снижение уровня Th1-клеток у C57Bl/6-мышей с помощью антител к CD4 или благодаря введению ИЛ-4 приводит к уменьшению поражений аорты на 80–90 %; 2) у мышей линии BALB/c, нокаутированных по STAT-6 (фактор транскрипции, контролирующий экспрессию ИЛ-4), у которых соотношение Th1/Th2 равно 8,11 (у родительской линии — 0,83), при содержании на атерогенной диете развиваются такие же поражения аорты, как и у мышей C57Bl/6.

Эти полученные *in vivo* результаты трудно объяснить влиянием ИФН- $\gamma$  на скорость захвата клетками модифицированных ЛПНП, поскольку данные, полученные в экспериментах *in vitro*, говорят, скорее, об “антиатерогенных” эффектах этого цитокина. Так, в работе [19] на культуре человеческих моноцитов/макрофагов показано, что ИФН- $\gamma$  снижает уровень мРНК СР класса А. Параллельно было установлено уменьшение количества сайтов, связывающих ацетилированные ЛПНП на клеточной мембране, без изменения их аффинности. Показано также, что инициированные ИФН- $\gamma$  эффекты сопровождаются ингибированием индуцированной ацетилированными ЛПНП аккумуляции ХС в макрофагах, что выражается в снижении внутриклеточного содержания ХС как в свободной, так и в эстерифицированной формах. В другом исследовании, выполненном на перитонеальных макрофагах мыши, установлено, что преинкубация со средами, кондиционированными Th1-клетками клона HDK-1 или КонаА-стимулированными спленоцитами от BALB/c мышей, приводила к замедлению деградации ацетилированных ЛПНП в макрофагах, чего не наблюдалось после преинкубации макрофагов со средой, кондиционированной Th2-клетками клона D-10 [18]. В супернатантах активированных спленоцитов был обнаружен ряд цитокинов, включающий ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ГМ-КСФ и ИФН- $\gamma$ . В отличие от сред, кондиционированных активированными спленоцитами, супернатанты активированных HDK-1-клеток не содержали ИЛ-4, а D-10-клеток — ИФН- $\gamma$ . Доминирующая роль ИФН- $\gamma$  в ингибирующем деградацию ацетилированных ЛПНП эффекте изучаемых супернатантов была подтверждена тем, что 1) антитела к ИФН- $\gamma$  на 70 % отменяли ингибирующий эффект сред, кондиционированных Th1-клетками клона HDK-1; 2) добавление к макрофагам рекомбинантного ИФН- $\gamma$  существенно ингибировало деградацию ацетилированных ЛПНП, уменьшало количество связывающих сайтов на клеточной мембране и заметно снижало скорости интернализа-



ции и транспортировки липопротеинов в лизосомы без изменения скорости их деградации в самих лизосомах. О подавлении захвата и деградации модифицированных ЛПНП макрофагами после их инкубации с супернатантами активированных лимфоцитов сообщают и другие авторы [4, 17].

Таким образом, влияние ИФН- $\gamma$  на захват и деградацию модифицированных ЛПНП должно, скорее, препятствовать образованию пенистых клеток, и его атерогенные эффекты, наблюдаемые в моделях *in vivo* на уровне целостного организма, следует объяснять какими-то другими клеточными эффектами этого цитокина. Одним из таких механизмов действия ИФН- $\gamma$ , способствующих атерогенезу, может быть его влияние на удаление ХС из клеток. Обнаружено [30], что ИФН- $\gamma$  при добавлении к нагруженным ХС макрофагам способен существенно влиять на соотношение свободного ХС и ЭХС в клетках, повышая активность АХАТ и, тем самым, способствуя накоплению ЭХС. Повышенная эстерификация ХС, сопровождающаяся оттоком его из плазматической мембраны в цитоплазму, заметно тормозит захват и удаление ХС из клеток с помощью ЛПВП, что приводит к трансформации макрофагов в пенистые клетки. Подавление ИФН- $\gamma$  процесса удаления ХС из клетки объясняется ингибирующим влиянием этого цитокина на экспрессию мембранного белка, который называется АТФ-связывающим кассетным переносчиком 1 (АТФ-binding cassette transporter 1 — ABC1) и участвует в транспорте ХС [44]. Установлено, что наблюдаемое при воздействии ИФН- $\gamma$  резкое (в 3–4 раза) снижение ABC1 и уровня его мРНК осуществляется благодаря активации фактора транскрипции STAT-1. Об этом свидетельствует то, что в нагруженных ХС макрофагах мышей, нокаутированных по гену STAT-1, ИФН- $\gamma$  не вызывает ни снижения уровня ABC1, ни подавления оттока ХС через плазматическую мембрану, ни стимуляции активности АХАТ [44]. О необходимости активации STAT-1 для проявления стимулирующего эффекта ИФН- $\gamma$  на активность АХАТ говорят и результаты исследований других авторов [45].

Относительно еще одного цитокина, ТРФ- $\beta$ 1, обнаруживаемого в атеросклеротических бляшках и, возможно, участвующего в регуляции процесса атерогенеза, известно, что он также способен супрессировать связывание и деградацию модифицированных ЛПНП макрофагами. Показано, что обработка этим цитокином ТНР-1-клеток в процессе их дифференцировки в макрофаги дозозависимо подавляет активность СР класса А до уровня, наблюдаемого в недифференцированных ТНР-1-моноцитах [7]. При этом снижается как

количество СР на клеточной мембране, так и аффинность рецептора. Обработка клеток антителами к ТРФ- $\beta$  уменьшает ингибирование деградации  $^{125}\text{I}$ -ацетилированных ЛПНП с 61 до 8 %. В то же время на деградацию  $^{125}\text{I}$ -нативных ЛПНП ТРФ- $\beta$  не влияет. Обнаружено, что ТРФ- $\beta$  снижает активность АХАТ в ТНР-1-макрофагах. Помимо этих эффектов ТРФ- $\beta$  увеличивает интенсивность оттока ХС из клеток, повышая экспрессию АВС1, что показано на нагруженных ХС макрофагах мышей, нокаутированных по гену апоЕ [29]. Установлено также, что ТРФ- $\beta$  может предотвращать снижение экспрессии АВС1 и подавление оттока ХС, вызванные действием ИФН- $\gamma$ . Таким образом, ТРФ- $\beta$  может регулировать метаболизм ХС в макрофагах, и этот эффект опосредуется влиянием цитокина на экспрессию и функциональную активность СР, а также на АВС1-зависимый процесс удаления ХС из клеток.

### **Влияние цитокинов на перераспределение холестерина внутри клеток**

Интернализация атерогенных липопротеинов макрофагами не является единственной возможной причиной накопления в них ЭХС и их превращения в пенистые клетки; другим интенсивно изучаемым механизмом аккумуляции ЭХС в клетках, в том числе в макрофагах, является перераспределение ХС в клетке за счет выхода свободного ХС из плазматической мембраны с его последующей эстерификацией и накоплением в цитоплазме. Подобные изменения могут быть следствием гидролиза мембранного липида сфингомиелина, который удерживает ХС в мембране и служит его мембранным “якорем”. Активность сфингомиелиназы — фермента, осуществляющего гидролиз сфингомиелина с образованием церамида [8, 14], — регулируется несколькими цитокинами, и, таким образом, под контролем цитокинов оказываются выход ХС из мембран и увеличение цитоплазматического пула свободного ХС, приводящее, в свою очередь, к снижению внутриклеточного синтеза ХС и стимуляции его эстерификации [14, 33]. При этом, в отличие от накопления ЭХС, индуцированного модифицированными ЛПНП, стимуляция эстерификации ХС, обусловленная действием сфингомиелиназы, не сопровождается увеличением общего клеточного пула ХС [36]. Церамид, выделяющийся при гидролизе сфингомиелина, может активировать фосфолипазу А2, увеличивая таким образом эндогенный пул свободных жирных кислот, необходимых для эстерификации освобождающегося из мембраны ХС [6].

Хотя и активация сфингомиелиназы, и захват модифицированных ЛПНП извне приводят, в конечном итоге, к одному и тому же результату — аккумуляции ЭХС в цитоплазме макрофагов, пути эстерификации ХС в этих двух случаях различаются по многим важным характеристикам. Известно, что в процесс эстерификации ХС, индуцированной липопротеинами, вовлечены два последовательных внутриклеточных пути везикулярного транспорта ХС. Первый — “проксимальный”, включает доставку ХС от лизосом к плазматической мембране [39], второй — “дистальный” [35], подразумевает транспорт ХС от плазматической мембраны (или от ассоциированного с плазматической мембраной пула ХС, который служит субстратным пулом для АХАТ) к АХАТ, которая первично локализована в эндоплазматическом ретикулуме [10], хотя не исключаются и другие внутриклеточные локализации, включая ассоциацию с плазматической мембраной. Можно было бы ожидать, что механизм транспорта ХС к АХАТ после выхода свободного ХС из мембраны, индуцированного активацией сфингомиелиназы, совпадает с “дистальной” частью эстерификационного пути, индуцированного атерогенными липопротеинами. Однако специальное исследование этого вопроса, проведенное на мышинной макрофагальной линии J774.A1, показывает, что перенос ХС, освобождающегося в результате действия сфингомиелиназы, к АХАТ осуществляется с помощью отдельного клеточного механизма [35]. Продемонстрировано, что в отличие от процесса эстерификации ХС, индуцированного липопротеинами, который является энергетически зависимым и требует участия интактного актинового цитоскелета [41] и цистеиновой протеиназы, разрушающей эндогенный ингибитор транспортировки ХС к АХАТ [34], стимуляция эстерификации ХС сфингомиелиназой не зависит от всех вышеперечисленных факторов [35]. Дополнительно показано, что обработка J774-клеток сфингомиелиназой приводит к повышению везикуляции плазматической мембраны, и этот процесс резистентен к энергетическому истощению клетки (снижению внутриклеточной концентрации АТФ на 98 %). Авторы высказывают предположение о том, что везикулы, образование которых было индуцировано сфингомиелиназой как результат опосредованной керамидом реорганизации липидов плазматической мембраны, доставляют ХС к оптимальным для стимуляции активности АХАТ внутриклеточным участкам, являясь одновременно донорами ХС, так как они содержат мало сфингомиелина [35].

Описанный выше механизм аккумуляции ЭХС в макрофагах может иметь большое значение в патофизиологии атеросклероза,

представляя собой альтернативный путь образования пенистых клеток. В то же время этот путь является объектом цитокиновой регуляции и может активироваться такими провоспалительными цитокинами, как ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1, которые, как установлено, способны активировать сфингомиелиназу и вызывать интенсивный гидролиз мембранного сфингомиелина [9, 21, 31]. Следует ожидать, что воздействие цитокинов должно приводить к увеличению количества свободного ХС в клетках и стимуляции синтеза ЭХС, катализируемого АХАТ. Действительно, установлено [1, 4], что среды, кондиционированные активированными лимфоцитами и макрофагами мыши, стимулировали эстерификацию ХС, оцениваемую по скорости включения меченого олеата в ЭХС, в перитонеальных макрофагах мыши, инкубируемых без добавления экзогенных модифицированных ЛПНП, т.е. в условиях, когда поступление ХС извне невозможно, и наблюдаемые изменения объясняются перераспределением ХС внутри клеток. Наиболее вероятными кандидатами на роль действующего агента в этих экспериментах являются провоспалительные цитокины, содержащиеся в супернатантах активированных иммунокомпетентных клеток. Такое предположение подтверждается тем, что аналогичный эффект был обнаружен у рекомбинантного ФНО- $\alpha$ : добавление этого цитокина (в дозе 100 нг/мл) к макрофагам в 4 раза увеличивало скорость включения меченого олеата в ЭХС и во фракцию триглицеридов, а также включение меченого глицерина в триглицериды. В то же время скорость включения меченого ХС в ЭХС макрофагов под влиянием ФНО- $\alpha$  заметно уменьшалась. Это кажущееся противоречие можно объяснить эффектом разбавления метки: предполагая, что ФНО- $\alpha$  активирует сфингомиелиназу, следует ожидать увеличения пула свободного ХС в макрофагах, который начинает конкурировать за включение в ЭХС с добавленным извне меченым ХС, уменьшая, тем самым, скорость его включения в ЭХС [1]. Стимулирующее действие ФНО- $\alpha$  (а кроме того, ИЛ-1 и ИФН- $\alpha$ ) на скорость включения глицерина в триглицериды обнаружено также на другом типе клеток (клеточной линии HepG2) [20].

Связь между вызванной действием ФНО- $\alpha$  активацией сфингомиелиназы и эстерификацией ХС детально изучена на культуре фибробластов человека [11]. Обнаружено, что при обработке клеток в течение 5 мин ФНО- $\alpha$  происходит двукратное повышение активности сфингомиелиназы по сравнению с контролем. Эта реакция приводит к гидролизу сфингомиелина, что было доказано уменьшением массы сфингомиелина и радиоактивности, связанной с меченым сфинго-

миелином, и сочетается с четырехкратным увеличением скорости внутриклеточного образования холестерилолеата. Кроме того, показано, что эта реакция стимулирует также мобилизацию [<sup>3</sup>H]холестерина, ассоциированного с плазматической мембраной, и его эстерификацию в реакции, осуществляемой АХАТ. После обработки клеток ФНО- $\alpha$  уровень ЭХС повышается более чем в 3 раза по сравнению с контролем. Предварительная обработка клеток моноклональными антителами к нейтральной сфингомиелиназе блокирует индуцированную ФНО- $\alpha$  внутриклеточную эстерификацию ХС. При этом синтез ЭХС в клетке при действии ФНО- $\alpha$  остается неизменным.

### Заключение

Если подразделять все эффекты цитокинов на основные, обусловленные главной физиологической направленностью их действия, и неспецифические, связанные с их влиянием на другие клеточные функции [2], то, по-видимому, влияние рассматриваемых выше цитокинов на холестеринный обмен в макрофагах следует отнести к неспецифическим эффектам. Но с другой стороны, естественно предположить, что изменения обмена ХС в макрофагах, получивших специфический цитокиновый сигнал, должны быть как-то скоординированы с выполнением клетками их специфической функции, определяемой этим сигналом. Таким образом, метаболические изменения в клетках, возникающие при действии цитокинов, можно рассматривать как часть специфического клеточного ответа на активацию, и они должны изучаться в качестве необходимого компонента этого ответа. В то же время нарушение координации между этими физиологически обусловленными компонентами (основным и неспецифическими) может приводить к развитию различных патологических состояний. Особенно часто такие нарушения физиологических соотношений между различными клеточными функциями могут, вероятно, возникать при одновременном воздействии на клетки различных цитокинов и других регуляторных факторов, имеющих разные основные эффекты. Таким нарушением, имеющим громадное практическое значение, является один из ранних этапов атерогенеза, характеризующийся трансформацией макрофагов в пенные клетки. В связи с этим основная часть работ по влиянию цитокинов на холестеринный обмен в макрофагах посвящена данной проблеме и направлена на создание современной патофизиологической концепции атерогенеза.

Многочисленные результаты экспериментальных исследований, полученные за последние десятилетия и частично рассмотренные

выше, не оставляют сомнений в том, что 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. Однако полученные данные еще не складываются в ясную логичную картину, которая позволила бы обосновать новые эффективные методы профилактики и лечения атеросклероза, и поэтому необходимы дальнейшие исследования вопроса цитокиновой регуляции обмена ХС в макрофагах, использующие новейшие биотехнологические методы.

### Библиографический список

1. Душкин М.И., Перминова О.М., Сафина А.Ф и др. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. — 2004. — № 6. — С. 52–56.
2. Козлов В.А. // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1. — С. 5–8.
3. Нагорнев В.А. // Арх. пат. — 1998. — Т. 60. — С. 39–43.
4. Перминова О.М. Влияние окисленных производных холестерина на функциональную активность иммунокомпетентных клеток: Дис. ... канд. мед. наук. — Новосибирск, 1999. — 172 с.
5. Титов В.Н. // Рос. кардиол. журн. — 1999. — Т. 5. — С. 39–48.
6. Akiba S. // Yakugaku Zasshi. — 2003. — Vol. 123. — P. 845–853.
7. Bottalico L.A., Wager R.E., Agellon L.B. et al. // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 22866–22871.
8. Cai Z., Bettaieb A., Mahdani N.E. et al. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 6918–6926.
9. Chakraborty G., Ziemba S., Drivas A. et al. // J. Neurosci. Res. — 1997. — Vol. 50. — P. 466–476.
10. Chang C.C.Y., Chen J., Thomas M.A. et al. // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 29532–29540.
11. Chatterjee S. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 879–882.
12. Clinton S.K., Underwood R., Hayes L. et al. // Amer. J. Pathol. — 1992. — Vol. 140. — P. 301–316.
13. Cornicelli J.A., Butteiger D., Rateri D.L. et al. // J. Lipid Res. — 2000. — Vol. 41. — P. 376–383.
14. Degan B.M., Bourdelat-Parks B., Daniel A. et al. // Ann. Clin. Lab. Sci. — 1996. — Vol. 26. — P. 234–242.
15. De Villiers W.J., Fraser I.P., Gordon S. // Immunol. Lett. — 1994. — Vol. 43. — P. 73–79.
16. De Villiers W.J.S., Fraser I.P., Hughes D.A. et al. // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180. — P. 705–709.
17. Fogelman A.M., Seager J., Haberland M.E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. — P. 922–926.
18. Fong L.G., Fong T.A.T., Cooper A.D. // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265. — P. 11751–11760.
19. Geng Y.J., Hansson G.K. // J. Clin. Invest. — 1992. — Vol. 89. — P. 1322–1330.

20. Grunfeld C., Dinarello C.A., Feingold K.R. // *Metabolism*. — 1991. — Vol. 40. — P. 894–898.
21. Hofmeister R., Wiegmann K., Korherr C. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1997.— Vol. 272. — P. 27730–27736.
22. Hsu H.Y., Nicholson A.C., Hajjar D.P. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 7767–7773.
23. Huber S.A., Sakkinen P., David C. et al. // *Circulation*. — 2001. — Vol. 103. — P. 2610–2616.
24. Ishibashi S., Inaba T., Shimano H. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 14109–14117.
25. Liao H.-S., Matsumoto A., Itakura H., Doi T. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — Vol. 19. — P. 1872–1880.
26. Maziere C., Barbu V., Auclair M. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1996. — Vol. 1300. — P. 30–34.
27. Nicoletti A., Kaveri S., Caligiuri G. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 102. — P. 910–918.
28. Osterud B., Bjorklid E. // *Physiol. Rev.* — 2003. — Vol. 83. — P. 1069–1112.
29. Panousis C.G., Evans G., Zuckerman S.H. // *J. Lipid Res.* — 2001.— Vol. 42. — P. 856–863.
30. Panousis C.G., Zuckerman S.H. // *J. Lipid Res.* — 2000. — Vol. 41. — P. 75–83.
31. Pekary A.E., Chopra I.J., Berg L. et al. // *Thyroid*. — 1997. — Vol. 7. — P. 647–654.
32. Sasaguri T., Arima N., Tanimoto A. et al. // *Atherosclerosis*. — 1998. — Vol. 138. — P. 247–253.
33. Scheek S., Brown M.S., Goldstein J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 11179–11183.
34. Schissel S.L., Beatini N., Zha X. et al. // *Biochemistry*. — 1995. — Vol. 34. — P. 10463–10473.
35. Skiba P.J., Zha X., Maxfield F.R. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 13392–13400.
36. Slotte J.P., Bierman E.L. // *Biochem. J.* — 1988. — Vol. 250. — P. 653–658.
37. Stemme S., Faber B., Holm J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — Vol. 92. — P. 3893–3897.
38. Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M. et al. // *Nature*. — 1997. — Vol. 386. — P. 292–296.
39. Tabas I. // *Curr. Opin. Lipidol.* — 1995. — Vol. 6. — P. 260–268.
40. Tabas I. // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 110. — P. 905–911.
41. Tabas I., Zha X., Beatini N. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 22547–22556.
42. Van der Kooij M.A., Morand O.H., Kempen H.J. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1996. — Vol. 16. — P. 106–114.
43. Van Lenten B.J., Fogelman A.M. // *J. Immunol.* — 1992. — Vol. 148. — P. 112–116.
44. Wang X.-Q., Panousis C.G., Alfaro M.L. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2002. — Vol. 22. — P. e5–e9.
45. Yang J.-B., Duan Z.-J., Yao W. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 20989–20998.
46. Young J.L., Libby P., Schonbeck U. // *Thromb. Haemost.* — 2002. — Vol. 88. — P. 554–567.